

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III**



TESIS DOCTORAL

**Integración de enzimas lacasas en el proceso de
producción de etanol de lignocelulosa: efecto
sobre la hidrólisis enzimática y la fermentación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alfredo Oliva Taravilla

DIRECTORAS

**Elia Tomás Pejó
Marie Demuez**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**INTEGRACIÓN DE ENZIMAS LACASAS EN
EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE
ETANOL DE LIGNOCELULOSA: EFECTO
SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y LA
FERMENTACIÓN**

.....

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad
Complutense de Madrid presentada por:

Alfredo Oliva Taravilla

DIRECTORAS: Dra. Elia Tomás Pejó y Dra. Marie Demuez

Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Energía

Madrid, 2016

Memoria presentada por Alfredo Oliva Taravilla para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de las Doctoras Elia Tomás Pejó y Marie Demuez

Madrid, 2016.



Fdo.: Alfredo Oliva Taravilla

IMDEA Energía



Fdo.: Dra. Elia Tomás Pejó

Investigadora Posdoctoral de IMDEA Energía

Unidad de Procesos Biotecnológicos



Fdo.: Dra Marie Demuez

Investigadora Posdoctoral de IMDEA Energía

Unidad de Procesos Biotecnológicos

Hace mucho tiempo, alguien muy sabio me descubrió el secreto de la
vida: cuanto mejor te lo pasas, mejor te sale todo

Bill Murray

Agradecimientos

Son muchas las personas que han colaborado y participado de forma directa como indirecta y que han hecho realidad el desarrollo y redacción de la presente Tesis Doctoral. A todas estas personas les estoy muy agradecido, ya que han contribuido de una manera inconmensurable a que fuera una experiencia de lo más satisfactoria.

En primer lugar quiero darles las gracias a mis directoras de Tesis, por su dedicación, paciencia y su infinita ayuda a todas mis cuestiones y dificultades durante estos años de trabajo. A la Dra. Elia Tomás-Pejó le agradezco infinitamente su ayuda ya que sin ella no habría sido posible la realización de esta Tesis, le doy las gracias por compartir su tiempo y conocimientos y aportar siempre sus numerosas ideas y enseñarme a, cómo no sólo ser mejor científico sino persona. A Dra Marie Demuez codirectora de esta Tesis, también le agradezco su ayuda tanto en los momentos malos como en los buenos ya que sin sus puntos de vista y conocimientos este trabajo no habría salido adelante.

También tengo mucho que agradecerle a la Dra. Mercedes Ballesteros, por acogerme en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de poder llevar a cabo un trabajo de investigación durante cuatro años, durante los cuales sus comentarios y opiniones han servido no sólo para la redacción de la Tesis Doctoral, sino también para guiarme a conseguir los objetivos.

No puedo olvidarme tampoco a la Dra. Cristina González, le tengo que agradecer siempre no sólo por sus aportaciones a la Tesis, sino también por sacar un poco de tiempo no sólo para mí sino para todos, ha sido siempre un placer tener su puerta abierta, aún en días malos para poder comentar y dar su grano de arena y ayuda inestimable. Gracias por tus conversaciones que me han ayudado a centrarme para conseguir mis objetivos y crecer también como persona.

A todos los miembros de la unidad de biocarburantes del CIEMAT, en especial a los Drs. Ignacio Ballesteros, José Miguel Oliva, María José Negro y Paloma Manzanares, por ayudarme en todo momento, ya que sin su colaboración y apoyo este trabajo no hubiera salido adelante. Por supuesto gracias a Felicia, José María, Alberto, Aleta, Cristina y Luis por sus ánimos continuados.

Al Dr. David Ibarra investigador titular del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, por sus comentarios y respuestas a todas las dudas sobre “infrarrojos”, sin su inestimable ayuda no hubiera sido posible la escritura.

A todos mis compañeros de la Unidad de Procesos Biotecnológicos de IMDEA Energía Lara, Beatriz, Ahmed, Santi, Chema, Edu, da igual que hayan sido tres años, seis meses o una semana, gracias por las risas y tonterías que hacen que uno no vea tan cuesta arriba la Tesis. Al resto de compañeros de IMDEA Energía, porque uno ya no sabe cuántos cumpleaños tiene uno en un año, sois muchos para nombraros, y no querría dejarme a alguien en el tintero, pero gracias por todo y también por las cañas de después, hace que uno desconecte de verdad.

Tampoco puedo olvidar a peña rockera, los dos mosqueteros: Víctor, y Gerardo, Joselyn, Nerea y más gente que aunque haya sido una noche, dos o no se sabe cuántas, nos hemos reído y pasado bien.

Sin duda tengo que agradecer mucho a la gente que me acogió en su casa sin dudarlo para poder ofrecerme un pequeño rincón apacible en el que pudiera escribir, Aleix, Carol y Cati, muchas gracias por vuestra amistad y por cederme ese huequín. A los compis de viaje, peruanos o islandeses de adopción. Jose, Rosi, Miguel, Alberto, Amalia, Helga, Jordi, Alba, Cristina y Gema, siempre os agradeceré aguantar esos “nervios tesianos” y por tenerme de compañero de viaje.

Por último, gracias a vosotros, a mis padres y hermana, que sois los que primera mano desde siempre me habéis apoyado no sólo en la Tesis sino en todo mi camino hasta el día de hoy y dejarme ser y estudiar lo que siempre he querido, gracias por vuestro esfuerzo.

Índice

ABREVIATURAS

RESUMEN	i
---------------	---

SUMMARY	v
---------------	---

RESUMEN EXTENSO	ix
-----------------------	----

1.INTRODUCCIÓN	22
----------------------	----

1.1. OBJETIVO E INTERÉS DEL TEMA	26
--	----

1.2. EL BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE DE AUTOMOCIÓN	27
--	----

1.2.1 Situación actual	27
------------------------------	----

1.2.2. Tecnologías de producción de bioetanol	29
---	----

1.2.2.1. Tecnologías de primera generación	29
--	----

1.2.2.2. Tecnologías avanzadas	30
--------------------------------------	----

1.3. BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	31
--	----

1.3.1. Estructura de la lignocelulosa	31
---	----

1.3.1.1. Celulosa	32
-------------------------	----

1.3.1.2. Hemicelulosas	33
------------------------------	----

1.3.1.3. Lignina	34
------------------------	----

1.3.1.4. Otros componentes	38
----------------------------------	----

1.4. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE PROCESOS BIOQUÍMICOS A PARTIR DE PAJA DE TRIGO	39
--	----

1.4.1 Pretratamiento	39
----------------------------	----

1.4.1.1. Explosión por vapor	41
------------------------------------	----

1.4.2. Hidrólisis enzimática	44
------------------------------------	----

1.4.3. Fermentación	46
---------------------------	----

1.4.4. Procesos de destoxificación	48
--	----

1.4.4.1. Métodos físicos	48
--------------------------------	----

1.4.4.2. Métodos químicos	49
---------------------------------	----

1.4.4.3. Métodos biológicos (biodestoxificación)	49
--	----

1.4.4.3.1. Métodos enzimáticos	51
--------------------------------------	----

1.4.4.3.2. Peroxidasas ligninolíticas	51
---	----

1.4.4.3.3. Lacasas	52
--------------------------	----

1.4.4.3.3.1. Lacasas en plantas	55
---------------------------------------	----

1.4.4.3.3.2. Lacasas bacterianas.....	55
1.4.4.3.3.3. Lacasas fúngicas.....	55
1.4.5. Lacasas fúngicas en procesos de biodestoxificación de materiales lignocelulósicos pretratados.....	57
1.5. INTEGRACIÓN DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO	58
1.5.1. Hidrólisis y fermentación separada (HFS).....	59
1.5.2. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)	59
1.5.3. Bioproceso consolidado (BPC)	60
1.5.4. Integración de la etapa de biodestoxificación con lacasas.....	61
2. OBJETIVOS	65
3. RESULTADOS PUBLICADOS	67
Artículo 1	
Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw	69
Artículo 2	
Inhibition of Cellulose Enzymatic Hydrolysis by Laccase-Derived Compounds from Phenols.....	89
Artículo 3	
Phenols and lignin: key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase	109
Artículo 4	
Effect of laccase dosage on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded wheat straw	129
Artículo 5	
Optimization of the laccase detoxification step in hybrid hydrolysis and fermentation processes from wheat-straw by <i>K. marxianus</i> CECT 10875	145
4. DISCUSIÓN	165
4.1. ELUCIDANDO LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LACASA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA.	168

4.2. EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN GENERADOS POR LA LACASA SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	174
4.3. PAPEL DE LA LIGNINA EN LA INHIBICIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN PRESENCIA DE LACASA	179
4.4. EFECTO DE LA DOSIS DE LACASA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA POR EXPLOSIÓN POR VAPOR	184
4.5. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE DESTOXIFICACIÓN CON LACASA EN PROCESOS DE HFH CON <i>K. MARXIANUS</i> CECT 10875	187
5. CONCLUSIONES.....	193
6. BIBLIOGRAFÍA.....	197

Abreviaturas

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural

AC: ácido *p*-cumárico

AF: ácido ferúlico

AFEX: pretratamiento por explosión por vapor con amoníaco (“*ammonia fiber explosion/expansion*”)

ANOVA: análisis de la varianza

ATR-FTIR: Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier- reflectancia total atenuada (“*attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy*”)

BPC: bioproceso consolidado

CBH: celobiohidrolasa

CLC: complejos lignina carbohidrato

DyP: peroxidasa decoloradora de tintes

EG: endoglucanasa

FPasa: actividad de papel de filtro

GEI: gases de efecto invernadero

HFH: hidrólisis y fermentación híbrida

HFS: hidrólisis y fermentación separadas

HyDyF: hidrólisis separada de la destoxificación y de la fermentación

LiP: lignina peroxidasa

LMt: lacasa de *Myceliophthora thermophila*

LPc: lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*

MnP: manganeso peroxidasa

MPC: material pretratado completo

PEG: polietilenglicol

PER: plan de energías renovables

PS: peso seco

PSFS: presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas

PV: peroxidasa versátil

RGR: recuperación de glucosa relativa

ROS: radicales libres del oxígeno (“*reactive oxygen species*”)

RSI: residuo (fracción) sólido(a) insoluble

RSR: residuo sólido remanente

SA: sirringaldehido

SDFS: sacarificación y destoxificación y fermentación simultáneas

SFS: sacarificación y fermentación simultáneas

UE: Unión Europea

UI: unidad internacional

V: vainillina

Resumen

Los objetivos prioritarios de las políticas energéticas de los Estados miembros de la Unión Europea se dirigen a aumentar la seguridad del abastecimiento energético, garantizar la competitividad de la economía, la disponibilidad de una energía asequible, promover la sostenibilidad ambiental y luchar contra el cambio climático. Para ello, el Parlamento Europeo ha aprobado compromisos de reducción, respecto a 1990, del 20% mínimo de las emisiones de CO₂, una participación del 20% mínimo de renovables en el total del consumo de energía en la U.E. y una participación del 10% mínimo de biocombustibles en el transporte por carretera. Entre las alternativas disponibles, el bioetanol lignocelulósico representa una de las opciones más atractivas para alcanzar los objetivos propuestos en el sector transporte.

De entre los materiales lignocelulósicos disponibles, la paja de trigo es uno de los sustratos más interesantes por su abundancia, su distribución a nivel mundial y por tratarse de un residuo agrícola que evita interferencias con otros mercados como el de la alimentación humana. Por estos motivos se ha elegido como materia prima para la realización de esta Tesis Doctoral.

Debido a la naturaleza recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, la conversión eficiente de los carbohidratos que contienen estos sustratos en etanol resulta un proceso complejo en el que se requieren varias etapas. Estas son: (1) el pretratamiento que altere la estructura recalcitrante de la lignocelulosa facilitando el acceso de las enzimas hidrolíticas a la celulosa; (2) la hidrólisis enzimática de los carbohidratos (celulosa y hemicelulosas) hasta azúcares fermentables y (3) la fermentación de los azúcares simples a etanol mediante un microorganismo fermentador.

Aunque en los últimos años se ha avanzado significativamente en el desarrollo de los procesos y tecnologías de producción de etanol lignocelulósico, todavía existen diversos obstáculos que deben superarse para facilitar su comercialización. Entre ellos, la utilización del material pretratado completo (fracción soluble e insoluble) que permita el aprovechamiento de todas las fracciones de carbohidratos de la biomasa y, por tanto incrementar los rendimientos de conversión a etanol, así como la reducción en el uso de agua y la generación de efluentes contaminantes. Sin embargo, la presencia en la fracción soluble de ciertos compuestos generados durante el pretratamiento limita el uso del material pretratado completo. Entre los diferentes compuestos se encuentran los fenoles procedentes de la solubilización parcial de la lignina, que pueden actuar como

inhibidores para las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentadores. Por tanto, para poder utilizar el material pretratado completo, y permitir una alta eficiencia del proceso fermentativo, los medios deben contener la menor concentración de compuestos inhibidores posible, por lo que se hace necesario una etapa de destoxificación. Entre los diferentes métodos de destoxificación, los tratamientos *in situ* con lacasas han demostrado ser una opción prometedora. Las lacasas eliminan de forma específica la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en la fracción soluble del material pretratado, reduciendo su toxicidad y acortando la fase de adaptación del microorganismo fermentador, mejorando los rendimientos de etanol.

Existen evidencias en la bibliografía de que, aunque la destoxificación con lacasas permite mejorar la fermentabilidad de los hidrolizados de biomasa pretratada proveniente de cultivos de cereales (paja de trigo, cebada, rastrojo de maíz, etc.), afecta a las celulasas obteniéndose menores rendimientos de hidrólisis y por tanto menores recuperaciones de glucosa.

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de las lacasas sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada para conseguir una eficaz integración de la destoxificación en el proceso de producción de bioetanol. Para ello, se utilizaron dos lacasas fúngicas provenientes de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Myceliophthora thermophila*, y se estudió su efecto sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa en términos de glucosa recuperada. Se ha demostrado que, tanto los radicales fenoxilos como los polímeros fenólicos originados por la oxidación de los fenoles libres por parte de la lacasa, se comportan como compuestos inhibidores para las enzimas hidrolíticas. La reactividad de los compuestos fenólicos es dependiente tanto de su estructura como de la complejidad y diversidad en la composición fenólica del prehidrolizado, influyendo en el grado de inhibición de la hidrólisis enzimática.

Se ha demostrado que la modificación de la lignina presente en la paja de trigo pretratada durante el tratamiento con las lacasas, juega un papel determinante en la inhibición de la hidrólisis enzimática. La oxidación de las unidades fenólicas de la lignina, estaría causando un cambio en la hidrofobicidad de la fibra de lignina provocando un aumento de las interacciones lignina-carbohidrato que dificulta el acceso de las celulasas al sustrato. Este aumento en las interacciones lignina-carbohidrato, unido al efecto negativo que ejercen los compuestos fenólicos originados por la oxidación de lacasa sobre las endoglucanasas y celobiohidrolasas, afecta negativamente al rendimiento de hidrólisis enzimática de la celulosa.

Tras esclarecer los mecanismos inhibitorios que provoca las lacasas sobre la hidrólisis enzimática, el siguiente objetivo que se planteó en esta Tesis, fue el de integrar la etapa de destoxificación al proceso de producción de bioetanol. Por ello, se estudió el efecto de la dosis de lacasa sobre la hidrólisis enzimática con el fin de establecer si menores cargas de lacasas eran efectivas para reducir la toxicidad de los medios sin afectar la hidrólisis enzimática. Se comprobó que la dosis de lacasa necesaria (0,1 UI/g PS) para no afectar la hidrólisis enzimática de la paja de trigo pretratada, no mejoraba la fermentabilidad de los hidrolizados cuando se empleaba *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 como microorganismo fermentador.

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la imposibilidad de utilizar una dosis de lacasa que reduzca la toxicidad de los medios sin afectar la hidrólisis enzimática, se diseñó una estrategia de proceso, denominada hidrólisis y fermentación híbrida (HFH), en la que se realiza una etapa de hidrólisis enzimática o presacarificación previa a la etapa de destoxificación. A su vez, se estudió la carga mínima de lacasa así como, el tiempo de destoxificación y el inóculo de levadura necesarios para mejorar la fermentabilidad del material pretratado. Se observó que 0,5 UI/g PS de lacasa eliminó el 70% del contenido fenólico total. Sin embargo, se hizo imprescindible la optimización del tiempo de destoxificación, debido que a tiempos de destoxificación prolongados, se obtenían bajas concentraciones y productividades volumétricas de etanol. Este resultado se debió a un incremento en las concentraciones de otros inhibidores, tales como el ácido acético, lo que causó una inhibición de la capacidad fermentativa de *K. marxianus* CECT 10875. Por otro lado, la presencia de otros inhibidores en el material pretratado completo hizo necesario el uso de altas cargas de inóculo de levadura. Cabe destacar que el uso de la configuración de HFH permitió eliminar el efecto negativo que ejerce el tratamiento con lacasa sobre la hidrólisis enzimática. Además, la optimización de los parámetros anteriores dio lugar a una destoxificación del material pretratado que hizo posible la fermentación del MPC por *K. marxianus* CECT 10875 y mejoró de forma significativa los rendimientos de producción y productividades volumétricas de etanol.

Summary

One of the main priorities of the Member States of the European Union is the exploration of new energy resources and the use of renewable energies that ensure the energy supply and reduce the greenhouse gas emissions. Various government policies, such as Directive 2009/28/EC, propose the gradual replacement of fossil fuels by renewable fuels. Among the available alternatives, liquid biofuels such as lignocellulosic bioethanol represent one of the most attractive options to achieve the objectives in the transport sector.

Among the lignocellulosic materials, wheat straw is very abundant, distributed worldwide, does not compete with food and can be found as agricultural residue. Due to this, it has been chosen as raw material in the present Doctoral Thesis. However, due to the recalcitrant nature of lignocellulose, the efficient extraction of carbohydrates containing these substrates is a complex process that requires several steps: (1) pretreatment that alters the recalcitrant structure of lignocellulose facilitating the access of hydrolytic enzymes to cellulose; (2) enzymatic hydrolysis of carbohydrates (cellulose and hemicellulose) and (3) fermentation of sugars to ethanol by a fermentative microorganism.

In spite of the recent developments in the technologies of lignocellulosic ethanol production, there are still several obstacles that must be overcome to make the process economically viable. Among them, a better use of slurry to allow the use of all sugars contained in the biomass. The latter would increase the ethanol yields, improve the water economy and reduce the generation of polluting effluents. However, the presence of certain compounds generated during pretreatment limits the use of slurries because these compounds act as inhibitors for hydrolytic enzymes and fermentative microorganisms. Therefore, for a better use of the slurry, a detoxification stage that eliminates or reduces the inhibitors becomes necessary. Among the different detoxification methods, *in situ* laccase treatment is a promising strategy. Laccases remove specifically the phenolic compounds from slurries, reduce the toxicity of the broth shortening the lag phase of the fermentative microorganism and increasing the ethanol yields. Although laccase detoxification improves the fermentability of the pretreated substrates, its application on pretreated biomass from cereal crops (wheat straw, barley, corn stover, etc.) reduces hydrolysis yields.

The main objective of this Thesis was to study the effect of laccase treatment on the enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw to get an optimum integration of the detoxification step in the bioethanol process. Two fungal laccases from *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* were used, and their effects on the enzymatic hydrolysis were studied in terms of glucose recovery. It has also been shown that phenoxy radicals and phenolic polymers generated by laccase oxidation, behave as inhibitors for hydrolytic enzymes. The reactivity of the phenolic compounds is dependent on its structure. The complexity and diversity in the phenolic composition of prehydrolyzates influence the degree of inhibition of the enzymatic hydrolysis.

Moreover, the presence of lignin plays a key role in inhibiting the enzymatic hydrolysis. Oxidation of lignin phenolic units by laccase would change the hydrophobicity of the fiber causing an increase in lignin-carbohydrate interactions. This increase in lignin-carbohydrate interactions and the negative effect of the compounds from the oxidation by laccase, exert a greater inhibition on cellobiohydrolases and endoglucanases.

After elucidating the inhibitory mechanisms of laccases on the enzymatic hydrolysis, the next objective of the present Thesis was to integrate the detoxification step into the bioethanol production process. In this context, the effect of different laccase loads on the enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw was analyzed. It was proved that the laccase dosage that does not affect the enzymatic hydrolysis (0.1 IU/ g DW) was not enough to improve the fermentability of the prehydrolysates using *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 as fermentative microorganism.

In this context, due to the difficulties in using a laccase dosage that reduces the toxicity of the broths without affecting the enzymatic hydrolysis, a new strategy called hybrid hydrolysis and fermentation (HHF) was designed. In addition, the minimum load of laccase to improve the fermentability of the pretreated material, the time of detoxification and yeast inoculum were optimized. In this configuration, a presaccharification is performed before the detoxification. It was shown that 0.5 IU/g PS of laccase removed 70% of the total phenolic content. However, the optimization of the detoxification times was necessary. Prolonged detoxification times caused low concentrations and volumetric productivities of ethanol, because of the increasing concentrations of other inhibitors such as acetic acid, causing an inhibition in the fermentative capacity of *K. marxianus* CECT 10875. Furthermore, the presence of other inhibitors in the slurry made requisite the use of high yeast inoculum loads. It is worth

highlighting that the optimization of above mentioned parameters of detoxification and the use of HHF configuration resulted in an adequate detoxification of the pretreated material which made possible the fermentation by *K. marxianus* CECT 10875 and led to significantly improved ethanol yields and volumetric productivities

Resumen Extenso

Introducción

Los biocombustibles líquidos (bioetanol y biodiésel) obtenidos a partir de biomasa, son una de las pocas alternativas para la diversificación del sector transporte a corto plazo y los únicos productos renovables que pueden integrarse fácilmente en los actuales sistemas de distribución de gasolina y gasóleo. Por ello, la promoción del uso de biocombustibles es una prioridad en la política energética de la Unión Europea dirigida a asegurar el suministro energético y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

El bioetanol es el biocombustible con mayor producción y consumo a nivel mundial y las materias primas más utilizadas para su producción son principalmente almidón procedente de cereal (USA y Europa) o la caña de azúcar (Brasil). Sin embargo, los cereales y el azúcar son productos básicos en la alimentación humana, por lo que el desarrollo del bioetanol a gran escala a partir de estas materias primas puede crear competencia entre el sector energético y el alimentario además de un incremento de los precios. Con objeto de no competir con los alimentos, y de no utilizar terrenos agrícolas dedicados a la alimentación, se hace necesario el desarrollo de tecnologías que permitan obtener biocombustibles denominados de segunda generación que utilicen materias primas no ligadas al sector alimentario. Estos biocombustibles se producen a partir de biomasa lignocelulósica abundante y barata como los residuos forestales, agrícolas o los provenientes de la industria agroalimentaria. La producción de etanol de biomasa lignocelulósica de bajo coste es la clave para que el etanol sea competitivo al compararlo con la gasolina.

A pesar de los avances realizados en los últimos años en el desarrollo de los procesos y las tecnologías de producción de bioetanol lignocelulósico, aún existen limitaciones que deben ser superadas para facilitar que estas tecnologías lleguen al mercado. La fermentación tradicional convierte la glucosa en etanol, pero en el caso de los materiales lignocelulósicos, la celulosa debe ser primero convertida a azúcares simples mediante un proceso de hidrólisis enzimática. Debido a la estructura recalcitrante de los carbohidratos que constituyen la biomasa, es necesario alterar la estructura de la fibra lignocelulósica y separar la fracción hemicelulósica, rica en xilosa mediante un pretratamiento. El objetivo del pretratamiento es aumentar la

susceptibilidad del material para obtener un sustrato lignocelulósico altamente accesible al ataque enzimático.

Durante el pretratamiento se generan ciertos compuestos (ácido acético, furanos y compuestos fenólicos) inhibidores de las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentadores. Por este motivo, es necesario introducir una etapa de destoxificación previa a las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación que permita reducir/eliminar los compuestos inhibidores y mejorar los rendimientos de estas dos etapas. Entre los métodos de destoxificación, el tratamiento enzimático utilizando enzimas lacasas para eliminar los compuestos fenólicos solubles representa una opción prometedora. No obstante, existen evidencias en la literatura que muestran que la destoxificación con lacasas de biomasa pretratada proveniente de cultivos de cereales (paja de trigo, cebada, rastrojo de maíz, etc.) afecta a las celulasas, obteniéndose menores rendimientos de hidrólisis y por tanto menores concentraciones de etanol.

En esta Tesis, se han estudiado las interacciones entre las enzimas lacasas y celulasas, así como los efectos que tienen los compuestos fenólicos generados por las lacasas sobre las celulasas. Tras el estudio de los mecanismos inhibitorios que provoca el tratamiento con lacasas sobre la hidrólisis enzimática, se optimizó la dosis de lacasa para obtener una destoxificación eficiente de los hidrolizados y se desarrollaron varias estrategias para integrar de manera eficiente la etapa de destoxificación enzimática en el proceso de producción de etanol.

Objetivos

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es obtener una integración eficaz del tratamiento con enzimas lacasas en el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa. Para la consecución del objetivo principal se han identificado los siguientes objetivos específicos.

- I) Entender los efectos que ejerce el tratamiento con lacasa sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor.
 - a. Esclarecer el papel de los radicales fenoxilo y los polímeros fenólicos formados por la oxidación de la lacasa en la inhibición de las enzimas hidrolíticas.

- b. Estudiar si la presencia de lignina, así como los cambios originados en su estructura por la acción de la lacasa, ejercen un efecto negativo sobre la hidrólisis enzimática.
- II) Diseñar una estrategia del proceso de producción de etanol incluyendo la etapa de destoxificación enzimática con lacasas sin que se vea afectada la hidrólisis enzimática de la celulosa.
- a. Estudiar el efecto de la dosis de lacasa sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor.
 - b. Evaluar el efecto de la dosis de lacasa, el tiempo de destoxificación y el tamaño de inóculo de levadura sobre la producción de etanol en un proceso de Hidrólisis y Fermentación Híbrida (HFH).

Resultados y Discusión

La biodestoxificación enzimática *in situ* utilizando lacasas de los prehidrolizados de paja de trigo obtenidos tras un pretratamiento de explosión por vapor, permite la reducción del contenido de compuestos fenólicos, derivados de la lignina aumentando su fermentabilidad (Moreno y col., 2013). Sin embargo, a pesar del efecto positivo sobre la fermentación se han observado reducciones en el rendimiento de hidrólisis enzimática (Moreno y col., 2012, Jurado y col., 2009). Aunque no existen evidencias claras acerca del mecanismo responsable de esta inhibición, existen en la bibliografía diferentes hipótesis para explicar este efecto inhibitorio de las lacasas sobre la hidrólisis enzimática:

(1) La oxidación de las unidades fenólicas de la lignina catalizada por la lacasa modifica la estructura de la lignina incrementando la adsorción no específica de las enzimas hidrolíticas sobre la lignina (Moilanen y col., 2011).

(2) El tratamiento con lacasa estaría fortaleciendo las uniones lignina-carbohidrato dificultando la accesibilidad de las celulasas a la celulosa (Moilanen y col., 2011).

(3) Los compuestos formados como consecuencia de la reacción de polimerización oxidativa de los compuestos fenólicos catalizada por lacasa, inhiben las enzimas hidrolíticas (Tejirian y Xu, 2011, Jurado y col., 2009).

Aunque todos estos mecanismos son aceptados para explicar la inhibición que ejercen las lacasas sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa, todavía no existen

evidencias claras de si realmente existe algún otro mecanismo de inhibición que actúe conjuntamente con los descritos anteriormente.

En este contexto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de las lacasas sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa de paja de trigo pretratada para su eficiente integración en el proceso de producción de etanol. Para ello, el trabajo se inició evaluando el efecto de la lacasa de *P. cinnabarinus* (LPc) sobre la hidrólisis enzimática de un compuesto celulósico modelo de alta pureza (Sigmacell), utilizando dos concentraciones de sustrato (5% y 10% peso/volumen (p/v)). Estos experimentos estaban enfocados a estudiar el efecto de la lacasa sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa utilizando un sustrato sin lignina. La adición de 10 Unidades Internacionales de LPc (UI)/g Peso Seco (PS) de sustrato durante la hidrólisis enzimática de 5% (p/v) de Sigmacell no tuvo un efecto significativo sobre la recuperación de glucosa relativa (RGR). En cambio, cuando se incrementó la carga de sustrato al 10% (p/v), la misma dosis de lacasa produjo un descenso estadísticamente significativo de casi 10 puntos porcentuales ($P < 0,01$) en recuperación de glucosa ($\% \text{ RGR} = [\text{g/L (glucosa ensayo)} / \text{g/L (ensayo control)}] \times 100$). La menor recuperación de glucosa observada en estos ensayos a mayor carga de sustrato puede atribuirse a cambios en los mecanismos de interacción y adsorción de las celulasas en presencia de lacasas. Debido a que las lacasas también tienen capacidad de adsorberse sobre la fibra de celulosa, pueden competir con las celulasas por los sitios de unión y estos efectos serían más acusados a mayor concentración de sustrato, y por lo tanto, a mayor cantidad de lacasa en el medio. Para comprobar si el aumento de la concentración de lacasa era el responsable de la reducción de la hidrólisis enzimática, se realizaron ensayos de hidrólisis con 10% (p/v) de Sigmacell en presencia de 1, 5, 10 y 15 UI de lacasa/g de sustrato. El aumento de la relación lacasa/enzimas hidrolíticas (L/H) desde 0,14%, en el caso de 1 UI/g, a 2,06% en el caso de 15 UI/g, redujo la RGR en 5 puntos porcentuales. Estos resultados, muestran una correlación entre el aumento de la dosis de lacasa y la disminución del rendimiento de hidrólisis enzimática.

Puesto que la hidrólisis enzimática de la celulosa implica la participación secuencial de varias enzimas, el siguiente paso fue determinar qué enzimas y en qué medida estaban inhibidas por las lacasas. Para ello, se evaluó el efecto directo de la lacasa sobre la actividad de las enzimas hidrolíticas en ausencia de celulosa. Celluclast 1.5L (celulasas) y Novo188 (β -glucosidasa) se incubaron en presencia de 0,5, 1 y 2 UI/mL de LPc y se determinaron las actividades de papel de filtro (FPasa) y β -

glucosidasa, respectivamente. En el caso de la actividad FPasa, el análisis de la varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas en ninguna de las dosis empleadas de lacasa. Por el contrario, la actividad β -glucosidasa mostró un ligero descenso de 7 puntos porcentuales ($P < 0,001$) en presencia de 2 UI/mL de lacasa. Estos resultados sugieren que la presencia de lacasas no afecta la actividad celulolítica y que la actividad β -glucosidasa se ve ligeramente afectada.

Una vez comprobado que las lacasas no inhiben significativamente la actividad del complejo celulolítico en ausencia de sustrato, se estudió su efecto sobre la hidrólisis enzimática paja de trigo pretratada por explosión por vapor. En primer lugar se estudió el efecto de las lacasas utilizando como sustrato la fracción del residuo sólido insoluble (RSI) cuya composición es principalmente celulosa y lignina. Moilanen y col. (2011) propusieron que los cambios producidos en la lignina por la acción de la lacasa originaba un cambio en su estructura que incrementaría la adsorción no específica sobre la lignina de las enzimas hidrolíticas, traducándose en menores recuperaciones de glucosa. En este contexto, se realizaron una serie de experimentos en presencia de polietilenglicol (PEG), el cual reduce la adsorción no específica de las celulasas a la lignina (Cannella y Jørgensen, 2014). En ausencia LPc, la adición de 5% de PEG (p/p), incrementó en 1,4 veces la RGR en comparación con el ensayo sin PEG lo que demostró que el PEG reduce las uniones inespecíficas de las celulasas a la lignina quedando más enzima disponible para la hidrólisis de la celulosa. Sin embargo, en los ensayos con LPc la adición de PEG no produjo incrementos significativos de la RGR. Estos resultados sugieren que el incremento de las uniones improductivas no parece ser la principal causa de las menores RGR obtenidas tras el tratamiento con lacasa y que son otros mecanismos los que provocan la inhibición de la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Con objeto de estudiar si las menores recuperaciones de glucosa eran provocadas por la presencia de los productos de reacción originados por la oxidación de la lacasa, se evaluó el efecto del tratamiento de la lacasa de *M. thermophila* (LMt) sobre la hidrólisis enzimática en presencia de compuestos fenólicos. En estos experimentos, y con el fin de que la presencia de lignina no interfiriera en los resultados, se utilizó como sustrato Sigmacell (sustrato modelo compuesto casi en su totalidad por celulosa). La hidrólisis enzimática se realizó en presencia de los fenoles simples vainillina (V), siringaldehído (SA) y ácido ferúlico (AF). La combinación de LMt con V o SA provocó una disminución en la glucosa recuperada del 42,6% y 32,6%, respectivamente. Sin

embargo, la combinación de LMt y AF no produjo disminución en la concentración de glucosa. Estos resultados indican que el efecto inhibitorio sobre la hidrólisis enzimática es dependiente del tipo de fenol y que son los productos generados por la rápida oxidación de los fenoles solubles mediante la lacasa los responsables de las menores recuperaciones de glucosa en la hidrólisis enzimática.

Debido a que en los prehidrolizados de paja de trigo contienen una mezcla compleja de diferentes compuestos fenólicos, se evaluó el efecto sobre la hidrólisis enzimática de los compuestos fenólicos V, SA y AF en combinaciones binarias (V+SA, V+AF, SA+AF) o terciarias (V+SA+AF). En todos los ensayos en los que V estuvo presente, se produjo un descenso de un 44% en la glucosa final recuperada en comparación con el ensayo control. Sin embargo, la combinación de SA+AF no produjo ningún efecto adverso sobre la hidrólisis enzimática. Estos resultados corroboran que el nivel de inhibición de la hidrólisis enzimática por la acción de los productos de reacción originados por la lacasa es dependiente del tipo de fenol pero también es dependiente de la combinación de fenoles en el medio.

El tratamiento con lacasas también provoca que los radicales fenoxilo de los compuestos fenólicos polimericen entre sí, originando fenoles poliméricos de alto peso molecular (Ghoul y Chebil, 2012). Estos polímeros podrían tener un efecto inhibitorio sobre las enzimas hidrolíticas (Tejirian y Xu, 2011). Estos autores observaron que los compuestos fenólicos poliméricos formaban uniones inespecíficas con las celulasas, lo que causaba las menores recuperaciones de glucosa. En este sentido, para elucidar si la inhibición de la hidrólisis enzimática era causada directamente por los radicales fenoxilo o por los productos formados por su polimerización, se añadió PEG al principio o tras 30 h de hidrólisis enzimática ya que el PEG reduce las interacciones entre las celulasas y compuestos fenólicos de estructura polimérica (Tejirian y Xu, 2011). Debido a que la V era el fenol que mostró mayor inhibición sobre la hidrólisis enzimática, los experimentos con PEG se realizaron exclusivamente en presencia de este fenol. Independientemente del tiempo de adición, el PEG no consiguió mitigar el efecto inhibitorio por lo que las uniones inespecíficas entre los compuestos poliméricos y las enzimas parecen no ser la razón de la inhibición de la hidrólisis enzimática. Tras 30 h de hidrólisis enzimática todos los radicales fenoxilo habrían polimerizado y por tanto, el PEG tendría que actuar reduciendo las interacciones entre los compuestos poliméricos y las enzimas hidrolíticas.

A la vista de estos resultados, se incubaron las enzimas hidrolíticas (celulasas y β -glucosidasas) en ausencia de sustrato, añadiendo LMt y V con el fin de elucidar si las menores recuperaciones de glucosa eran causadas por la acción de los radicales fenoxilo. Una serie de experimentos se realizaron añadiendo simultáneamente las celulasas y β -glucosidasas con LMt y V con el fin de someter a las enzimas a la acción de los radicales que se generan en la polimerización de la vainillina por la lacasa. En otra serie de experimentos, se añadieron las enzimas hidrolíticas tras 30 h de incubación de la lacasa y la V. Cuando las enzimas hidrolíticas se añadían simultáneamente, se observó una reducción del 55% y 66% de la actividad celulasa y β -glucosidasa, respectivamente. Por el contrario, la adición de las enzimas tras 30 h de incubación de LMt y V no produjo ninguna disminución de las actividades. Este resultado confirma, que en ausencia de lignina, las enzimas hidrolíticas son inhibidas por los radicales fenoxilo.

Los prehidrolizados obtenidos tras el pretratamiento por explosión por vapor de paja de trigo no contienen sólo fenoles, sino que presentan una compleja mezcla de compuestos fenólicos, azúcares hemicelulósicos y otros inhibidores (furanos y ácidos carboxílicos). Estos compuestos también podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre las celulasas (Ximenes y col. 2010). Por lo tanto, para evaluar el efecto conjunto de todos estos compuestos, se realizaron unas hidrólisis enzimáticas de Sigmacell (10% (p/v)) combinadas con el tratamiento con lacasa utilizando un prehidrolizado de paja de trigo, directamente o diluido al 50% (v/v). La presencia de lacasa en ambos ensayos no afectó notablemente a la recuperación de glucosa final. Este hecho indica que los otros compuestos tóxicos presentes en el prehidrolizado influyen de manera destacada en la inhibición de las enzimas hidrolíticas, y que el efecto de los radicales fenoxilo sobre las enzimas hidrolíticas derivado de la adición de lacasa queda enmascarado. De hecho, la recuperación de glucosa fue un 58% menor en el prehidrolizado sin diluir y un 32% menor en el diluido comparado con el ensayo donde se añadieron V, AF y SA en presencia de lacasa.

Por otro lado, el grado de inhibición de la hidrólisis enzimática por parte de los radicales fenoxilo depende de la presencia de otros compuestos fenólicos. Debido a la compleja composición fenólica del prehidrolizado se podrían estar promoviendo reacciones de polimerización entre los diferentes compuestos fenólicos. Como consecuencia, la formación de estos polímeros podría estar afectando la hidrólisis enzimática de una forma diferente a como lo hacían los radicales fenoxilo cuando la V

era el único fenol en el medio. En este contexto, la compleja composición fenólica del prehidrolizado daría lugar a una serie de compuestos fenólicos poliméricos muy distintos en estructura tridimensional al polímero resultante cuando hay un único fenol presente en el medio. Además, los fenoles poliméricos que se forman por la acción de la lacasa presentan un peso molecular entre 7 y 11 kDa y por tanto unas características en términos de solubilidad distintas a los de los fenoles simples (Ghoul y Chebil, 2012). En este sentido, estos polímeros, al tener un mayor peso molecular, estarían formando precipitados sobre la fibra de celulosa, impidiendo la unión efectiva de las celulasas a la fibra. Reforzando esta idea, las recuperaciones de xilosa no se vieron tan afectadas como las recuperaciones de glucosa. Este hecho indicó que la hidrólisis de los xilooligosacáridos se ve mucho menos afectada por los compuestos fenólicos poliméricos que la hidrólisis enzimática de la celulosa, debido a que la mayor parte de los xilooligosacáridos se encuentran en fase soluble.

Por lo tanto, a partir de los resultados anteriores se puede concluir que las condiciones de ensayo influyen en la polimerización de los radicales fenoxilo formados por la oxidación de la lacasa. La presencia de unos u otros fenoles simples en el medio provoca que sus respectivos radicales fenoxilo reaccionen directamente con las celulasas o polimericen entre ellos. En presencia de prehidrolizado, donde hay una compleja composición de fenoles y otros inhibidores, el papel de los radicales fenoxilo queda enmascarado por otros mecanismos de inhibición. La influencia de uno u otro dependerá de las condiciones de ensayo de hidrólisis enzimática, de la presencia de sustratos solubles e insolubles y de la compleja composición en compuestos fenólicos del prehidrolizado.

En este contexto, cabe destacar que los ensayos anteriores con Sigmacell se realizaron en ausencia de lignina. Sin embargo, la presencia de este polímero se hace inevitable cuando se utilizan materiales lignocelulósicos pretratados por explosión por vapor en el proceso de producción de etanol. Las lacasas pueden actuar sobre ciertas subunidades de la lignina alterando sus características estructurales. Estas modificaciones de la fibra de lignina pueden provocar que haya nuevas interacciones entre los polímeros de celulosa y lignina, y por otro lado pueden determinar el mecanismo de reacción de algunos compuestos fenólicos provocando su reincorporación a la fibra de lignina (Aracri y col., 2010; Barneto y col., 2012). Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se propuso como siguiente objetivo de esta presente Tesis Doctoral estudiar si la presencia de lignina, así como los cambios

originados en su estructura por la acción de la lacasa ejercen un efecto negativo sobre la hidrólisis enzimática. En primer lugar, se sometió al Sigmacell a hidrólisis enzimática en presencia de LMt y un extracto de lignina en una proporción celulosa:lignina de 2:1 y/o uno de los fenoles simples empleados en los experimentos anteriores (V, SA o AF). En los ensayos con lignina y lacasa en ausencia de fenoles, se produjo un descenso la liberación de glucosa del 37% en comparación con el ensayo sin lacasa. Esta inhibición fue del 55% en los ensayos con fenoles simples y lacasa. La presencia de fenol produjo un descenso aún mayor de la glucosa final recuperada en comparación con el ensayo con únicamente lignina y lacasa. Este mayor descenso puede deberse a la interacción producida entre las celulasas y los fenoles poliméricos y/o los radicales fenoxilo originados por la acción de la lacasa. Se midieron las concentraciones de celobiosa obtenidas tras esta misma hidrólisis enzimática (con Sigmacell, extracto de lignina, lacasa y/o fenoles), se observó un descenso tras 4 h, no detectándose niveles de celobiosa a las 24 h de hidrólisis enzimática. Siendo un efecto observable al inicio de la hidrólisis enzimática, significa que en presencia de lignina, tanto las endoglucanasas como las celobiohidrolasas se ven mucho más afectadas por el tratamiento por lacasa que las β -glucosidasas, debido a que la celobiosa es el producto final de las dos primeras (Moilanen y col., 2011; Ximenes y col., 2011). El análisis por ATR-FTIR del residuo sólido remanente (RSR) tras la hidrólisis en el ensayo tratado con lacasa y sin fenoles, mostró una reducción en la banda 1512 cm^{-1} , lo que confirma la oxidación de las subunidades fenólicas del extracto de lignina por la lacasa (Liu y col., 2014). Este resultado confirmaría el mecanismo sugerido por Moilanen y col. (2011), donde el tratamiento con lacasa provocaría un fortalecimiento de las uniones lignina-carbohidrato en los materiales lignocelulósicos. Estos resultados demuestran que el tratamiento con lacasa inhibe la hidrólisis enzimática al alterar directamente la estructura de la lignina. La presencia de fenoles produjo un descenso aún mayor de la glucosa final recuperada en comparación con el ensayo con únicamente lignina y lacasa, este mayor descenso puede deberse a la interacción producida entre las celulasas y los fenoles poliméricos y/o los radicales fenoxilo originados por la acción de la lacasa.

Los ensayos anteriores han puesto de manifiesto el efecto negativo de la lignina y los fenoles sobre la hidrólisis enzimática de un sustrato celulósico modelo tras el tratamiento con lacasa. Con el objetivo de comprobar este efecto sobre material lignocelulósico, tanto el RSI como el material pretratado completo (MPC) de paja de trigo pretratada por explosión por vapor, se sometieron a hidrólisis enzimática en

presencia de lacasa. En el caso particular del RSI, al carecer prácticamente de compuestos fenólicos solubles, se añadieron V, SA o AF. La suplementación con lacasa en ensayo con RSI tanto en presencia como en ausencia de fenoles provocó un descenso en la glucosa recuperada. Este resultado sugiere que las menores recuperaciones de glucosa observadas pueden ser debidas en mayor medida a las modificaciones producidas por la lacasa en el polímero de lignina que a los fenoles poliméricos. Es necesario tener en cuenta que la proporción de celulosa:lignina influye directamente en la cantidad de celulosa que queda disponible en el medio. Cuanto mayor sea la cantidad de lignina, más celulosas podrían quedar inespecíficamente adheridas a su superficie y por tanto podrían obtenerse menores rendimientos de hidrólisis. En este contexto, en el ensayo de hidrólisis enzimática con Sigmacell el ratio celulosa:lignina era de 2:1 lo que se corresponde con un ratio celulosa:lignina de 10 unidades de papel de filtro (UPF)/g lignina y 10 unidades de celobiosa (UCB)/g lignina. En cambio, en el ensayo de hidrólisis enzimática con el RSI, el ratio celulosa:lignina era un 40% más alto, lo que se tradujo en una relación celulosa:lignina de 14 UPF(UCB)/g lignina. En este último caso, la cantidad de celulosa potencialmente libre y activa sería mayor, lo que provocaría que el efecto de los fenoles simples sobre la hidrólisis enzimática no fuera tan evidente en comparación con el ensayo de hidrólisis enzimática de Sigmacell y lignina. En cuanto al ensayo de hidrólisis enzimática con el MPC, la presencia de lacasa provocó una reducción en la glucosa final de un 39%. A pesar de que la proporción de lignina en el MPC es mucho menor que en el RSI, la reducción de la recuperación de glucosa fue ligeramente más elevada que en el caso de la hidrólisis enzimática con el RSI en presencia de lacasa (32%). Este resultado indica que los diferentes compuestos presentes en el MPC y las reacciones cruzadas que pueden establecerse entre ellos tras el tratamiento con lacasa contribuirían en un mayor grado a la inhibición de la hidrólisis.

Todos estos resultados demuestran el papel crucial que ejerce la lignina sobre la hidrólisis enzimática. La presencia de lacasa provoca la modificación de la estructura de la lignina lo que se traduce en menores rendimientos de hidrólisis enzimática.

A la vista de los resultados obtenidos y a la gran influencia que ejerce la lignina sobre la hidrólisis enzimática tras el tratamiento con lacasa, el estudio y optimización de la dosis de lacasa puede contribuir a reducir las modificaciones en la estructura de la lignina y limitar la cantidad de radicales fenoxilo i/o fenoles poliméricos. Por lo tanto, el siguiente objetivo que se planteó en la presente Tesis fue el de comprobar el efecto de

distintas dosis de lacasa sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor. Para ello, se utilizaron como sustratos el RSI y el MPC al 10% (p/v) PS de consistencia en presencia de 0,1, 0,5, 5 y 10 UI de LMt /g PS de sustrato. Tras 48 h de hidrólisis se observaron diferencias en la recuperación de glucosa en ambos sustratos para todas las dosis de lacasa. No obstante, el análisis ANOVA mostró que no había diferencias significativas utilizando 0,1 UI/g PS de sustrato de dosis de LMt comparado con el ensayo control sin lacasa. El análisis por ATR-FTIR de los RSR del RSI y el MPC mostró menor intensidad en la banda 1512 cm^{-1} a medida que se aumentaba la dosis de lacasa lo que constata la probable relación existente entre la dosis de lacasa y el número de modificaciones producidas en el polímero de lignina. Se realizó un experimento de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con una etapa previa de destoxificación de 6 h con 0,1 UI/g PS de lacasa, utilizando el MPC (10% p/v) y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 como microorganismo fermentador. Tras 72 h de SFS el ensayo suplementado con lacasa mostró una producción de etanol muy baja, lo que sugiere que la reducción de la concentración de fenoles totales producida por 0.1 UI/g PS lacasa no fue suficiente para mejorar la fermentabilidad del material.

A la vista de los resultados de SFS obtenidos, se optimizó la dosis de lacasa con el objetivo de utilizar la dosis mínima necesaria para destoxificar el MPC. En este contexto, se evaluó el efecto de varias dosis de lacasa, el tiempo de destoxificación y el tamaño de inóculo de levadura sobre la producción de etanol en una estrategia de hidrólisis y fermentación híbrida (HFH) a partir del MPC con *K. marxianus* CECT 10875.

Para comprobar que la suplementación con lacasa mejora la fermentabilidad del MPC, se llevó a cabo un ensayo de HFH preliminar sin adición de lacasas. Tras 72 h de proceso de HFH, no hubo consumo de glucosa ni producción de etanol independientemente de la carga de inóculo de levadura (1 o 3 g/L PS), confirmándose la elevada toxicidad del MPC.

La recuperación de glucosa tras 12 h de presacarificación más 8 h de destoxificación con 2,75 UI/g PS de LMt, fue de $22,9 \pm 1,5\text{ g/L}$. Comparando con el control sin lacasa, donde la recuperación de glucosa tras 20 h de presacarificación fue de $23 \pm 0,5\text{ g/L}$, este resultado indica que la adición de lacasa tras 12 h de presacarificación no produce efecto inhibitorio sobre la hidrólisis enzimática. Cabe destacar la eficiencia de esta estrategia de realizar una presacarificación previa a la destoxificación para evitar la inhibición de la hidrólisis enzimática, cuando en un

proceso de destoxificación y SFS, la dosis de 0,5 UI/g PS de LMt provocó una inhibición significativa de la hidrólisis enzimática.

Por otro lado, la suplementación con 0,5 UI/g PS de lacasa produjo una reducción del contenido fenólico cercano al 70%, y fue suficiente para permitir la fermentación con *K. marxianus* CECT 10875.

Tras las etapas de presacarificación y destoxificación, los medios se inocularon 1, 2 o 3 g/L PS de *K. marxianus*. Según el análisis estadístico de Pareto, la dosis de lacasa no tuvo efecto estadísticamente significativo sobre la producción de etanol ni la productividad volumétrica. No obstante, el tiempo de destoxificación mostró un efecto estadísticamente negativo en la producción de etanol y en la productividad volumétrica de etanol a las 24 h de proceso. En el caso de la carga de inóculo, ésta tuvo un efecto positivo estadísticamente significativo tanto en la producción como en la productividad volumétrica de etanol. En este contexto, 0,5 UI/g PS de lacasa y 4 h de destoxificación fueron suficientes para evitar el efecto inhibitorio del MPC sobre la levadura. Este resultado indicó que 0,5 UI/g PS de lacasa es la dosis mínima de lacasa para reducir la toxicidad del MPC. No obstante, no se detectó producción de etanol en los ensayos con 12 h de destoxificación y 1 g/L de inóculo, por el contrario, los ensayos que fueron inoculados con 3 g/L PS de levadura mostraron las mismas concentraciones de etanol que los ensayos con 4 h de destoxificación y 1 o 3 g/L PS de inóculo. Este hecho pone de manifiesto que, debido a que ciertas levaduras tienen capacidad para asimilar algunos inhibidores y transformarlos en compuestos menos tóxicos, cargas altas de inóculo pueden evitar el efecto negativo que ejercen tiempos largos de destoxificación sobre la concentración y productividad volumétrica de etanol.

Estos resultados indican la importancia de optimizar la dosis de lacasa, así como el tiempo de destoxificación con el objetivo de mejorar las concentraciones y productividades volumétricas de etanol.

Conclusiones

El trabajo presentado en esta Tesis demuestra la participación de diferentes mecanismos en la inhibición de la hidrólisis enzimática tras el tratamiento con lacasas. Aunque se ha observado que todos los mecanismos de inhibición descritos previamente por otros autores participan en la inhibición de la hidrólisis enzimática, no todos tienen la misma importancia. En este contexto, los radicales fenoxilo han mostrado ser

potentes inhibidores de la actividad enzimática de las celulasas, no obstante, la presencia de uno o más compuestos fenólicos en el hidrolizado influye en la reactividad de estos radicales. Por otra parte, la presencia de otros inhibidores en los prehidrolizados de paja de trigo pretratada por explosión por vapor ejerce una gran inhibición sobre la hidrólisis enzimática enmascarando el efecto de los productos de reacción de la lacasa. La presencia de lignina es otro factor a tener en cuenta en la inhibición de la hidrólisis enzimática. La oxidación de las unidades fenólicas de la lignina por la lacasa, provocaría cambios en la hidrofobicidad de la fibra aumentando las interacciones lignina-carbohidrato. Este hecho, unido al tipo de sustrato empleado (RSI o MPC), la proporción de lignina de los diferentes sustratos y la presencia de compuestos fenólicos provocan un efecto adicional en la inhibición de la hidrólisis enzimática.

Los cambios que la lacasa ejerce en la lignina son dependientes de la dosis de lacasa. Se ha comprobado la importancia de la optimización de la dosis de lacasa. No obstante, la dosis óptima de lacasa para evitar la inhibición de la hidrólisis enzimática no fue suficiente para mejorar la fermentabilidad del MPC. La realización de una presacarificación inicial seguida de una destoxificación en una HFH consiguió mitigar el efecto negativo de las lacasas mejorando a su vez la fermentabilidad del MPC para *K. marxianus* CECT 10875.

Referencias

- Aracri E, Fillat A, Colom JF, Gutiérrez A, del Río JC, Martínez AT, Vidal T: **Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:8211-8216.
- Barneto AG, Aracri E, Andreu G, Vidal T: **Investigating the structure–effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps.** *Bioresource Technology* 2012, **112**:327-335.
- Cannella D, Jørgensen H: **Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production?** *Biotechnology and Bioengineering* 2014, **111**:59-68.
- Ghoul M, Chebil L: **Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases** En: Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2012.

- Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá A, Martínez AT, Martínez MJ: **Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol.** *Bioresource Technology* 2009, **100**:6378-6384.
- Liu, Hu, Wu Z, Zeng G, Huang D, Shen Y, He X, Lai M, Yibin He Y: **Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC.** *Environmental Science Pollution Research* 2014, **21**:14004-14013.
- Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L: **The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **49**:492-498.
- Moreno AD, Ibarra D, Ballesteros I, González A, Ballesteros M: **Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase.** *Bioresource Technology* 2012, **135**:239-45.
- Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M: **Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*-Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings.** *Biochemical Engineering Journal* 2013, **79**:94-103.
- Tejirian A, Xu F: **Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:239-47.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M: **Inhibition of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology* 2010, **46**:170-176.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M: **Deactivation of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:54-60.

1. Introducción

1.1. INTERÉS GENERAL DEL TEMA

La disminución de las reservas de petróleo, junto con el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI), ha generado un creciente interés por la producción y utilización de combustibles alternativos que sustituyan a los actuales combustibles fósiles. Los biocombustibles líquidos (bioetanol y biodiésel), obtenidos a partir de biomasa, son los únicos productos renovables que pueden integrarse fácilmente en los actuales sistemas de distribución y son una de las pocas alternativas de diversificación del sector transporte a corto plazo. Por todo ello, los biocombustibles constituyen una prioridad en las políticas energéticas de la Unión Europea dirigidas a asegurar el suministro energético y reducir las emisiones de GEI.

Los biocombustibles utilizados actualmente, i.e. el bioetanol obtenido de materias primas azucaradas o amiláceas y el biodiesel obtenido a partir de semillas oleaginosas, son denominados de primera generación. Estos biocombustibles se producen a partir de materias primas destinadas principalmente a la alimentación, lo que puede ocasionar competencia por las materias primas entre el sector energético y el alimentario. En este contexto, es necesario desarrollar biocombustibles avanzados como el etanol celulósico, derivado de materiales lignocelulósicos, que no entren en competencia directa con el mercado alimentario.

A pesar de los avances realizados en los últimos años en las tecnologías de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, aún existen limitaciones que deben ser superadas para facilitar que estas tecnologías lleguen al mercado. Debido a la naturaleza recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, la liberación de los carbohidratos mediante hidrólisis enzimática para su posterior conversión a etanol es un proceso costoso. Para mejorar la accesibilidad de los carbohidratos al ataque enzimático es necesaria una etapa previa de pretratamiento que permita alcanzar mejores rendimientos de hidrólisis y, por lo tanto, mayores producciones de etanol. Entre los diferentes pretratamientos de materiales lignocelulósicos, los métodos físicos-químicos como la explosión por vapor, se han mostrado muy eficaces para aumentar la digestibilidad de la celulosa (Ballesteros y col., 2006; Alvira y col., 2010). No obstante, durante el pretratamiento se generan ciertos compuestos inhibidores de las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentadores. Por este motivo, es muy interesante introducir una etapa de destoxificación previa a la etapa de hidrólisis enzimática y

fermentación que permita reducir y/o eliminar los compuestos inhibidores y mejorar los rendimientos de estas dos etapas. Entre los diversos métodos de destoxificación, el tratamiento enzimático utilizando enzimas lacasas representa una opción prometedora, ya que se realiza en condiciones de reacción suaves, se generan pocos subproductos y no se necesita equipamiento o energía adicional. No obstante, existen estudios que muestran que la destoxificación con lacasas de biomasa pretratada proveniente de cultivos de cereales (paja de trigo, cebada, rastrojo de maíz, etc.) afecta a las celulasas, obteniéndose menores rendimientos de hidrólisis y por tanto menores concentraciones de etanol. (Jurado y col., 2009; Moilanen y col., 2011; Moreno y col., 2012a).

En la presente Tesis, se han estudiado las interacciones entre las enzimas lacasas y celulasas, así como los efectos que tienen los compuestos originados en la reacción de oxidación de los fenoles sobre las celulasas. Con este fin, se han utilizado dos lacasas provenientes de los hongos *Pycnoporus cinnabarinus* y *Myceliophthora thermophila*. Tras el estudio de los mecanismos inhibitorios que provoca el tratamiento con lacasas sobre la hidrólisis, se optimizó la dosis de lacasa. Seguidamente se desarrollaron varias estrategias para integrar exitosamente la etapa de destoxificación enzimática con las etapas de hidrólisis y fermentación a etanol.

1.2. EL BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE DE AUTOMOCIÓN

1.2.1 Situación actual

A pesar de la gran diversificación que ha experimentado en los últimos años el sector energético, los combustibles fósiles siguen siendo la principal fuente de energía. Además, el transporte presenta una dependencia del 98% de los combustibles derivados del petróleo (Gómez y col., 2008). En este contexto, uno de los mayores retos del siglo XXI es encontrar nuevas fuentes de energía renovables, respetuosas con el medio ambiente y que aseguren el abastecimiento de combustibles para el transporte. Los biocombustibles líquidos son una alternativa viable para sustituir los combustibles fósiles para el transporte y, aunque no puedan a reemplazarlos totalmente a corto plazo, pueden contribuir de forma significativa a reducir la dependencia del petróleo y disminuir la producción de GEI.

La Unión Europea (UE), al igual que un gran número de países, se ha comprometido activamente con el objetivo de reducir las emisiones de CO₂,

estableciendo líneas de actuación para la sustitución paulatina de los carburantes de origen fósil por otros de naturaleza renovable. Concretamente, la Directiva 2009/28/CE, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, ha fijado como objetivo la participación de al menos un 10% de fuentes renovables en el sector del transporte. Acorde con esta Directiva, España ha establecido en el Plan de Energías Renovables (PER, 2011) una aportación de los biocarburantes en el sector transporte del 9,2% del conjunto total de energía en dicho sector para el año 2020.

El biocombustible líquido más utilizado es el bioetanol, un biocarburante obtenido a partir de la fermentación de materia orgánica vegetal rica en carbohidratos. Debido a su naturaleza renovable ayuda a combatir el cambio climático y contribuye a la reducción de las emisiones de GEI. Según la Agencia Internacional de la Energía (IEA), EEUU es el primer productor de bioetanol seguido de Brasil, la UE y Asia (<http://www.iea.org>). Desde el punto de vista comercial, el bioetanol puede utilizarse como combustible único, mezclado en diferentes proporciones con la gasolina o como aditivo de la misma. En la UE, las mezclas más habituales contienen un 5%, 10% o 15% de bioetanol (denominadas E5, E10 y E15, respectivamente). Mientras en otros países, como EEUU y Brasil, se comercializan combustibles con una proporción de bioetanol de 85 y 100%, requiriéndose vehículos con motores adaptados (*Flexible Fuel Vehicle*) para su utilización.

Actualmente, la mayor parte del bioetanol comercial se obtiene a partir de caña de azúcar, remolacha y cereales. Estas especies vegetales almacenan grandes cantidades de carbohidratos ya sea en forma de sacarosa (caña, remolacha) o almidón (cereales). El inconveniente de estas materias primas es que son destinadas principalmente a la alimentación. Este hecho ha provocado una gran controversia por la competencia que puede establecerse por las materias primas entre el sector alimentario y el energético. Con el objetivo de lograr la sustitución del 10% de combustibles de transporte por biocarburantes que establece la Directiva 2009/28/CE, el 9 de diciembre de 2015 se aprobó la Directiva (UE) 2015/1513 por la que se modifican la Directiva 98/70/CE, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo. Por otra parte, la anteriormente mencionada Directiva 2009/28/CE, establece una limitación del 7% en la contribución de los biocarburantes convencionales para 2020. En este contexto, los Estados miembros tienen la obligación de establecer unos objetivos nacionales de utilización de

biocarburantes avanzados que no provengan de materias primas alimentarias para ese mismo año.

1.2.2. Tecnologías de producción de bioetanol

El bioetanol combustible, se ha clasificado tradicionalmente atendiendo a la materia prima utilizada para su producción, diferenciándose entre el bioetanol de primera o segunda generación. El de primera generación corresponde al obtenido a partir de biomasa azucarada o amilácea y el de segunda generación se obtiene a partir de material lignocelulósico. Este material lignocelulósico puede ser de muy diversa procedencia como astillas, residuos agrícolas, forestales o residuos de la industria agroalimentaria. También puede obtenerse bioetanol a partir de residuos sólidos urbanos y de la industria papelera, a los que algunos autores clasifican como de tercera generación. En los últimos años también se ha dirigido la atención a la utilización de ciertos microorganismos como levaduras, hongos y microalgas, como fuentes potenciales para la producción de bioetanol y otros biocarburantes ya que pueden acumular grandes cantidades de carbohidratos y otros biocompuestos, incluyéndolos en un nuevo grupo de biocombustibles de cuarta generación. En este contexto, la clasificación del bioetanol en segunda, tercera o cuarta generación es poco concisa y por ello, cada vez existe una tendencia mayor en agrupar los nuevos procesos bajo el término de tecnologías avanzadas de producción de bioetanol.

1.2.2.1. Tecnologías de primera generación

El etanol de primera generación procede de materias primas azucaradas o amiláceas ricas en carbohidratos fácilmente fermentables. El proceso más sencillo consiste en utilizar para la producción de bioetanol, caña de azúcar, remolacha o sorgo dulce ya que estos vegetales contienen sacarosa. Para la fermentación de este disacárido no es necesario ningún pretratamiento previo debido a que las levaduras son capaces de fermentar dímeros glucídicos (Cardona y col., 2010). La mayor parte de bioetanol producido en Brasil, por ejemplo, proviene de caña de azúcar (Mussatto y col., 2010). Los sustratos ricos en almidón y dextrinas, como los granos de cereales, son también materias primas de las que se obtienen bioetanol de primera generación. En este caso, es necesario un tratamiento enzimático con α -amilasas para liberar la glucosa contenida en el almidón que posteriormente es fermentada a etanol. Actualmente el almidón

procedente de granos de cereales es el más usado para producir bioetanol en EEUU y en Europa (Torney y col., 2007, Cardona y Sánchez, 2007). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, estas materias primas son consideradas productos alimenticios básicos, por lo que su uso para la producción de bioetanol genera controversias puesto que su utilización en el sector energético puede aumentar los precios de los alimentos.

1.2.2.2. Tecnologías avanzadas

Dentro de este grupo se engloba el bioetanol procedente de cualquier materia prima vegetal que no compita con el sector alimentario. En este sentido, se considerarían pertenecientes a este grupo de materias primas los sustratos lignocelulósicos, ya sean provenientes de maderas, residuos agroforestales o residuos de la industria papelera. Todos estos sustratos tienen en común que contienen un alto porcentaje de carbohidratos en forma de celulosa, hemicelulosas o pectina. El empleo de estos materiales, además de no competir directamente con el sector alimentario, tiene la ventaja de que muchos de ellos se generan como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Es decir, no sólo no tienen valor económico en el contexto en el que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales durante su eliminación. Sin embargo, aunque ya están comenzando a operar las primeras plantas comerciales de etanol celulósico (Beta Renewables (Italia), Abengoa (EEUU), etc.), el proceso de conversión todavía requiere algunas mejoras para hacer esta tecnología competitiva con las de primera generación.

Debido a la estructura recalcitrante de la lignocelulosa, el proceso de producción de etanol lignocelulósico es más complejo que el del almidón y requiere un pretratamiento previo para desestructurar la fibra y aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Esto implica una mayor inversión en comparación con las instalaciones de primera generación (Galbe y col., 2010). Una vez producidos los azúcares mediante la hidrólisis enzimática, estos son fermentados por la acción de los microorganismos fermentativos. El proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa se detalla más ampliamente en la sección 1.3.

1.3. BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

El bioetanol obtenido a partir de lignocelulosa, al no competir con el sector alimentario, se considera una de las alternativas más viables para disminuir a corto plazo las emisiones de CO₂, y sustituir parcialmente el uso de gasolina. La lignocelulosa es el recurso renovable más abundante del planeta y los materiales lignocelulósicos también pueden producirse en cultivos dedicados específicamente a la producción de biomasa con fines energéticos. Sin embargo, una gran parte de los materiales con alto contenido en celulosa, susceptibles de ser utilizados como materia prima para la producción de bioetanol, se generan como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Entre los residuos agrícolas procedentes de los cultivos leñosos y herbáceos, hay que destacar los producidos en los cultivos de cereales y algunas plantas con utilidad industrial textil y oleícola. Otro tipo de biomasa residual que se puede emplear es la de origen forestal, es decir, la procedente de los tratamientos silvícolas y de mejora y mantenimiento de los montes y masas forestales. Asimismo, se podrían considerar los residuos generados en algunas industrias, como la industria papelera, y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

Entre los residuos lignocelulósicos agrícolas, la paja de trigo supone una opción interesante al estar disponible a escala mundial. La producción de este cereal para 2015 se estimó en 728 millones de toneladas (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>), lo que supondría una producción de 800 millones toneladas de paja de trigo potencialmente utilizable como materia prima para la producción de etanol (Bamaga y col., 2003). En este contexto, la paja de trigo se ha empleado como sustrato en la producción de bioetanol lignocelulósico en numerosos estudios (Ballesteros y col. 2006; Tomás-Pejó y col., 2009; Jurado y col., 2009; Moreno y col., 2013a) y es uno de los materiales preferiblemente utilizados por la planta comercial de Beta Renewables (Italia) (<http://www.betarenewables.com>).

1.3.1. Estructura de la lignocelulosa

La lignocelulosa es el componente estructural de la pared celular de las plantas. Los principales componentes que la conforman son la celulosa, las hemicelulosas y la lignina, cuyas proporciones varían dependiendo de la especie y del tipo de material. En la paja de trigo, la proporción de los tres componentes suele ser (% peso/peso): celulosa

(30-40), hemicelulosas (18-30) y lignina (17-20), aunque varía dependiendo de la edad, la variedad de trigo y de las condiciones climáticas (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de diferentes pajas de trigo utilizados en la producción de bioetanol.

Celulosa	Xilano*	Arabinano*	Galactano*	Lignina	Referencia
30,2	18,7	2,8	0,8	17,0	Ballesteros y col., 2006
37,8	22,8	1,6	1,0	18,1	Pérez y col., 2008
40,7	23,7	1,3	2,6	17,0	Tomás-Pejó y col., 2009
40,2	25,7	1,0	2,1	19,3	Alvira Tesis doctoral, 2011
40,5	22,7	2,1	1,3	18,1	Moreno y col., 2012a

* Componentes de la hemicelulosas

1.3.1.1. Celulosa

La celulosa es el componente estructural mayoritario de la pared celular de las plantas y el polímero más abundante sobre la superficie terrestre (Brown, 2003; Lavoine y col., 2012). Se trata de un homopolisacárido lineal constituido por monómeros de D-glucopiranososa (Figura 1), que se unen entre sí mediante enlaces glucosídicos β -(1,4) cuyo grado de polimerización puede alcanzar las 15000 unidades. Debido a la presencia de grupos hidroxilo laterales, estas cadenas de D-glucopiranososa interaccionan entre sí mediante puentes de hidrógeno formando microfibrillas, que a su vez interaccionan de nuevo para agruparse en macrofibrillas para finalmente generar la fibra de celulosa (Brown, 2003).

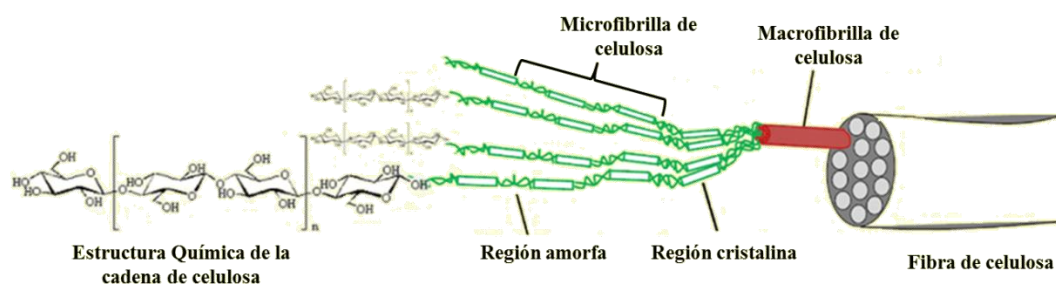


Figura 1. Detalle de la estructura molecular de la celulosa. Esquema adaptado de Lavoine y col., 2012.

1.3.1.2. Hemicelulosas

Junto a la celulosa, las hemicelulosas forman parte de la fracción azucarada de la lignocelulosa. Las hemicelulosas es un heteropolisacárido ramificado, cuyo grado de polimerización es mucho menor que la celulosa variando entre 70 y 200 unidades. El polímero de hemicelulosas incluye diversos monómeros como pentosas (β -D-xilosa y α -L-arabinosa), hexosas (β -D-glucosa, β -D-manosa y α -D-galactosa), ácidos urónicos y grupos acetilo (Sheller y Ulvskov, 2010). La proporción de estos compuestos varía dependiendo del material lignocelulósico. Por ejemplo, en maderas blandas (coníferas) el galactomanano es el componente principal, mientras que en las maderas duras (frondosas) el principal componente es el xilano altamente acetilado. En las plantas herbáceas, el xilano es también el componente más abundante aunque presenta menos residuos acetilo que en las maderas duras (Brett y Waldron, 1996, Gírio y col., 2010). En la paja de trigo, al igual que en el resto de las herbáceas, el componente mayoritario es el xilano formado por residuos de D-xilopiranosas unidos entre sí por enlaces glucosídicos β -(1,4), parcialmente acetilados y con ramificaciones laterales en posición O-3 de α -L-arabinofuranosa o D-xilopiranosas y en posición O-2 de ácido glucurónico o ácido 4-O-metil-glucurónico (Sun y col., 2005a; Scheller y Ulvskov, 2010).

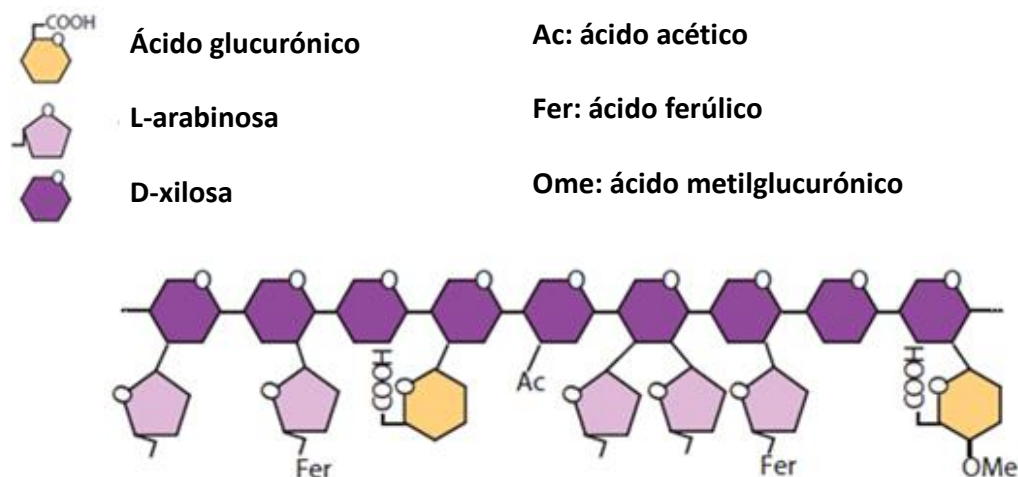


Figura 2. Detalle de la estructura molecular del glucuronoarabinoxilano presente en herbáceas. Esquema adaptado de Scheller y Ulvskov, 2010.

1.3.1.3. Lignina

La lignina es el tercer constituyente mayoritario de la lignocelulosa cuya función es la de proveer resistencia y protección a la planta frente a los agentes externos. La lignina es un heteropolímero aromático tridimensional formado por derivados de tres precursores fenilpropano (monolignoles), denominados hidroxipropil (H), guayacil (G) y siringil (S). Éstos derivan de los respectivos alcoholes cinamílicos, *p*-cumárico, coniferílico y sinapílico (Ralph y col., 2004). La principal diferencia entre las tres unidades radica en los diferentes sustituyentes metoxilo del anillo aromático (Figura 3). Las diferentes unidades monolignólicas se acoplan entre sí mediante un proceso de acoplamiento oxidativo catalizado por peroxidasas y lacasas en presencia de peróxido de hidrógeno u oxígeno, respectivamente (Ralph y col. 2004, Heitner y col. 2010). Aunque este proceso genera gran cantidad de formas resonantes que se van uniendo en multitud de enlaces, el enlace más favorecido es aquel producido entre el carbono de la posición β de la cadena lateral propenilo, y el grupo hidroxilo del anillo aromático del siguiente monolignol dando lugar a un enlace tipo β -O-4' (Figura 4).

Al igual que en las hemicelulosas, su composición y su localización depende de la especie vegetal. La lignina presente en maderas duras presenta un contenido mayoritario en unidades S y G con pequeñas cantidades de unidades H, mientras que en maderas blandas la lignina está formada principalmente por unidades G con pequeñas cantidades de unidades H (Sannigrahi y col., 2010). La lignina de las especies herbáceas

contienen las tres unidades en diferente proporción además de diferentes ácidos hidroxicinámicos como el ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico.

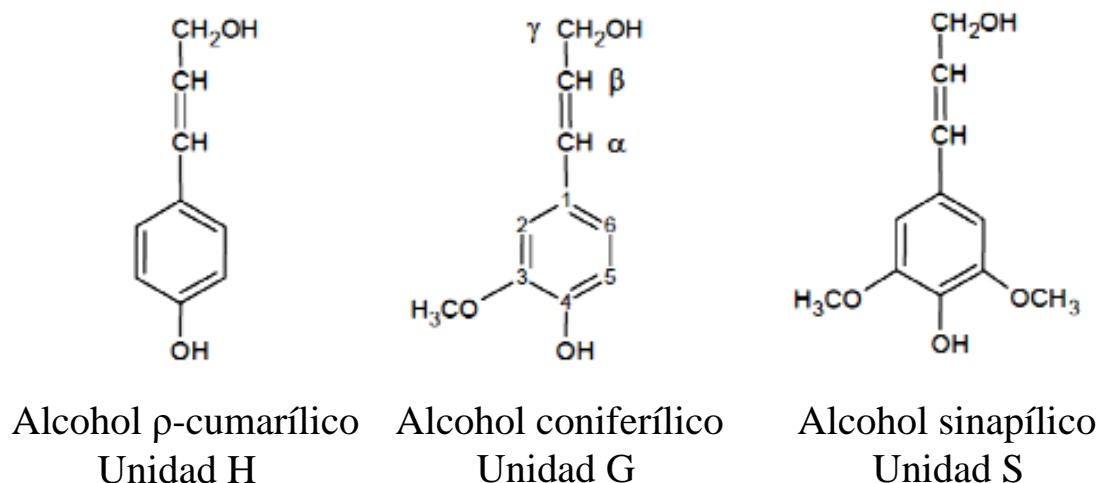


Figura 3. Estructuras químicas de los tres monolignoles que conforman la lignina.

En la paja de trigo, la lignina está compuesta por aproximadamente 49% de unidades G, 46% de unidades S y 5% de unidades H, con unos porcentajes de ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico que alcanzan el 5% de forma individual (Buranov y Mazza, 2008, Tomás-Pejó y col., 2008). La lignina de la paja de trigo está principalmente unida a las hemicelulosas mediante enlaces éter al carbono en posición α de la cadena lateral (Lam y col., 2001). Los ácidos hidroxicinámicos participan también en la unión entre el polímero de lignina y las hemicelulosas, concretamente con los residuos de las ramificaciones laterales, formando enlaces éster o éter con los residuos de α-L-arabinofuranoza y en menor medida con el ácido glucurónico o ácido 4-O-metilglucurónico (Buranov y Mazza, 2008).

El ácido ferúlico se une al polímero de lignina por enlaces éter y al carbono C-5 de la arabinosa por enlaces éster. Estos complejos lignina carbohidrato (CLC) se denominan ferulatos. A su vez, estos ferulatos pueden interaccionar entre sí y formar diferulatos mediante un amplio rango de enlaces tipo 4-O-5', 5-5', 8-O-4' etc. Ferulatos y diferulatos actúan como núcleos de lignificación en trigo y herbáceas (Figura 5), permitiendo la interacción entre varias cadenas de lignina-hemicelulosas y favoreciendo la copolimerización del polímero de lignina al servir como punto de anclaje en la pared celular durante las fases tempranas de lignificación (Buranov y Mazza, 2008).

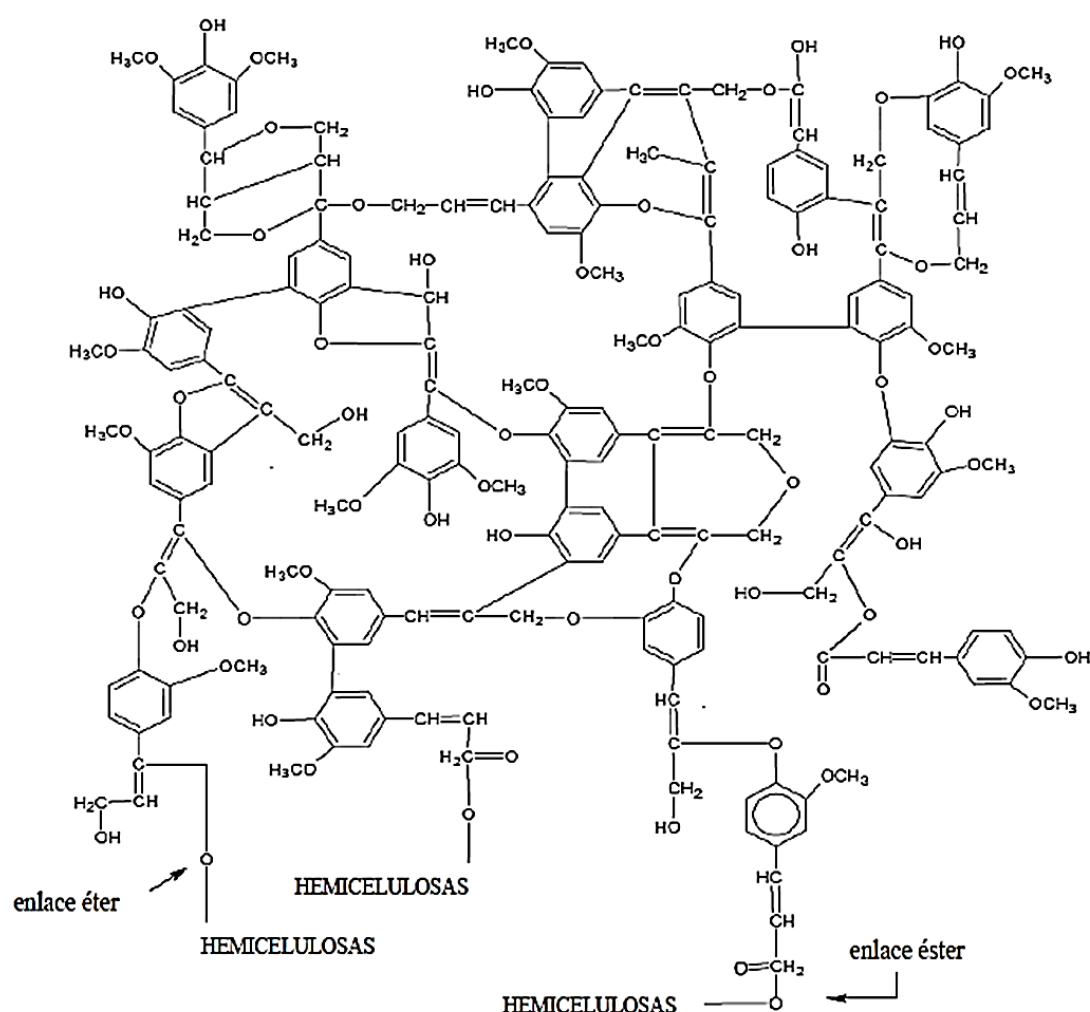


Figura 4. Estructura aproximada de la lignina en la paja de trigo.

Por su parte, la mayoría del ácido *p*-cumárico se encuentra unido a la lignina por enlaces éster (Lawther y Sun, 1996). Se ha observado que la lignina de la paja de trigo presenta acilaciones en las unidades siringilo de ácido *p*-cumárico en la posición del carbono γ de la cadena lateral (Lu and Ralph, 1999).

El alto contenido en ácidos hidroxicinámicos en la lignina de la paja de trigo confiere a este polímero una mayor solubilidad en álcali en comparación con las ligninas de maderas blandas y frondosas. La asociación entre estos ácidos y hemicelulosas hace que se obtenga una fracción soluble rica en CLC (Lawther y col., 1996). Dependiendo del tipo de enlace por el cual estos ácidos hidroxicinámicos se unen a la lignina (éster o éter) unos pretratamientos tendrán mayor impacto en la desestructuración de la lignina frente a otros. Por ejemplo, un tratamiento alcalino favorecería la rotura de los enlaces éster entre los CLC y los enlaces éster entre el ácido

p-cumárico y la lignina (Barman y col. 2012). Por el contrario, un tratamiento en condiciones ácidas favorecería la rotura de los enlaces éter presentes entre los monómeros de lignina resultando en la liberación de fenoles libres al medio (Saha y col., 2005) (Figura 6).

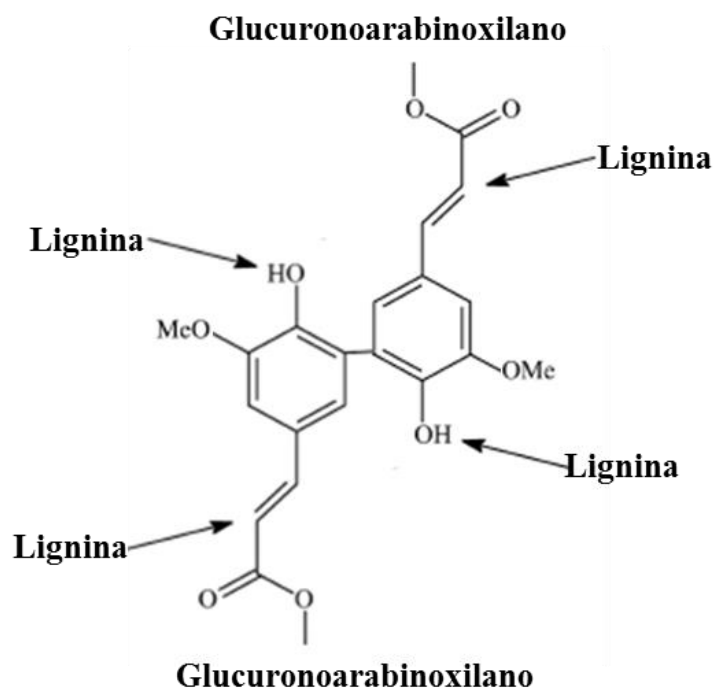


Figura 5. Incorporación de 5-5' diferulato en la lignina.

La presencia de la lignina afecta directamente a la actividad de las enzimas hidrolíticas, lo que se traduce en menores rendimientos de hidrólisis enzimática y por tanto de etanol. Se han aplicado distintos tratamientos con el objetivo de reducir el contenido de lignina de los materiales lignocelulósicos pretratados. Entre las diferentes alternativas para la deslignificación, las enzimas lacasas han sido usadas de forma eficaz en la industria papelera como sustitutivos a agentes blanqueantes (Ibarra y col., 2006). No obstante, su uso como agente deslignificante en materiales pretratados han dado resultados contradictorios. En paja de trigo pretratada, la adición de lacasas no sólo producía un aumento en el porcentaje de lignina Klason, sino que provocaba un descenso en los rendimientos de hidrólisis enzimática (Moreno, Tesis Doctoral, 2013; Moreno y col., 2012a). Estudiar este efecto negativo sobre la hidrólisis producido por el tratamiento con lacasas será uno de los objetivos estudiados en la presente Tesis Doctoral.

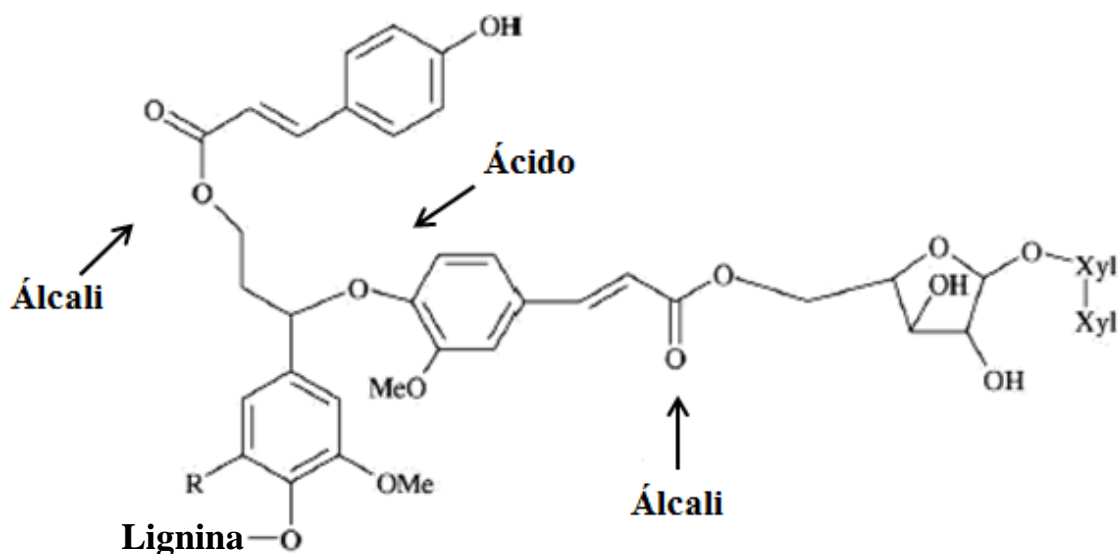


Figura 6. Sitios de rotura entre la lignina y CLC durante tratamientos alcalinos o ácidos. Esquema adaptado de Buranov y Mazza, 2008.

1.3.1.4. Otros componentes

En la biomasa lignocelulósica se pueden encontrar otros compuestos en menores proporciones como pectinas, extractivos y cenizas. Las pectinas son heteropolisacáridos formados por ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa y galactosa. Los extractivos incluyen una variedad heterogénea de compuestos como proteínas (extensinas), compuestos de carácter lipídico como terpenos, grasas o ceras, y otros compuestos como mucílagos, resinas, gomas, etc. Las cenizas representan el conjunto de compuestos inorgánicos como las sales minerales y metales pesados.

Todos estos compuestos, junto con la lignina y las hemicelulosas, conforman una matriz que engloba a las microfibrillas de celulosa las cuales se orientan de forma diferente en la pared celular ofreciendo resistencia y protección a la célula vegetal (Bidlack y col., 1992) (Figura 7).

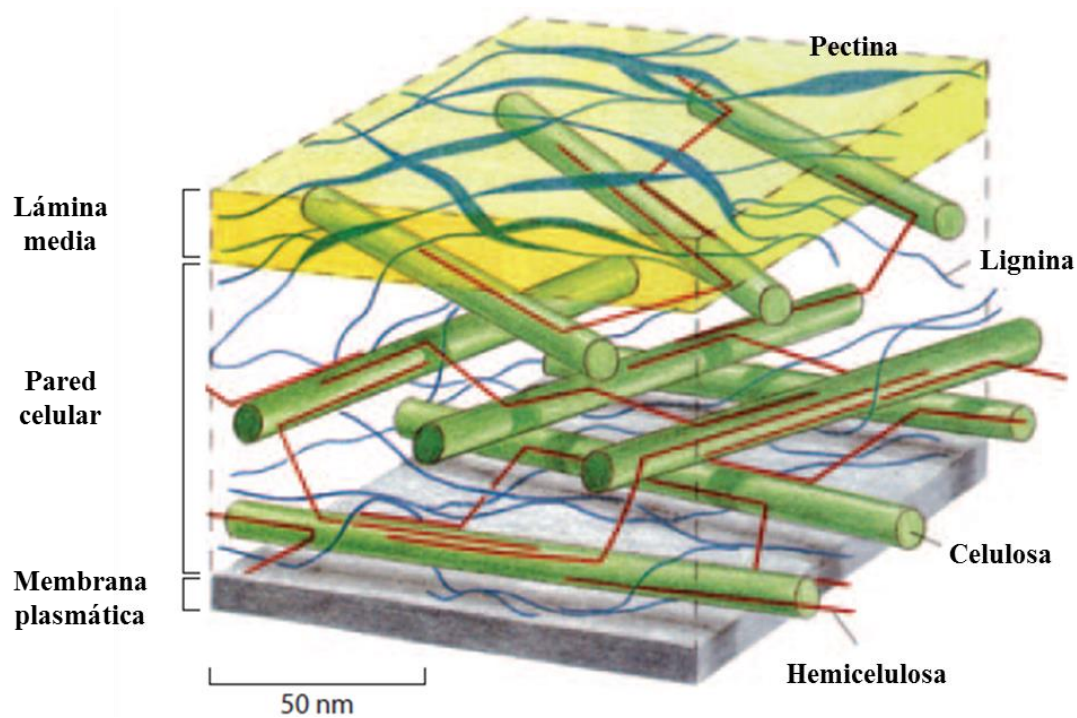


Figura 7. Modelo simplificado de la pared celular vegetal. Adaptado de Sheller y Ulvskov, 2010.

1.4. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE PROCESOS BIOQUÍMICOS A PARTIR DE PAJA DE TRIGO

La conversión de la paja de trigo en bioetanol mediante procesos bioquímicos se basa en la obtención de azúcares monoméricos mediante hidrólisis enzimática para su posterior transformación a bioetanol por un proceso de fermentación. Por ello, el proceso de producción de bioetanol por vía bioquímica consta principalmente de las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación (Figura 8).

1.4.1 Pretratamiento

La paja de trigo presenta una composición química compleja con diferentes enlaces covalentes entre los polímeros que la conforman, además de otras fuerzas intermoleculares de tipo no covalente (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.), que proporcionan una estructura muy compacta con alta resistencia a la ruptura y desorganización. Por ello, es necesario realizar un pretratamiento que altere la estructura compleja de la lignocelulosa, facilitando así la acción de los enzimas celulolíticos.

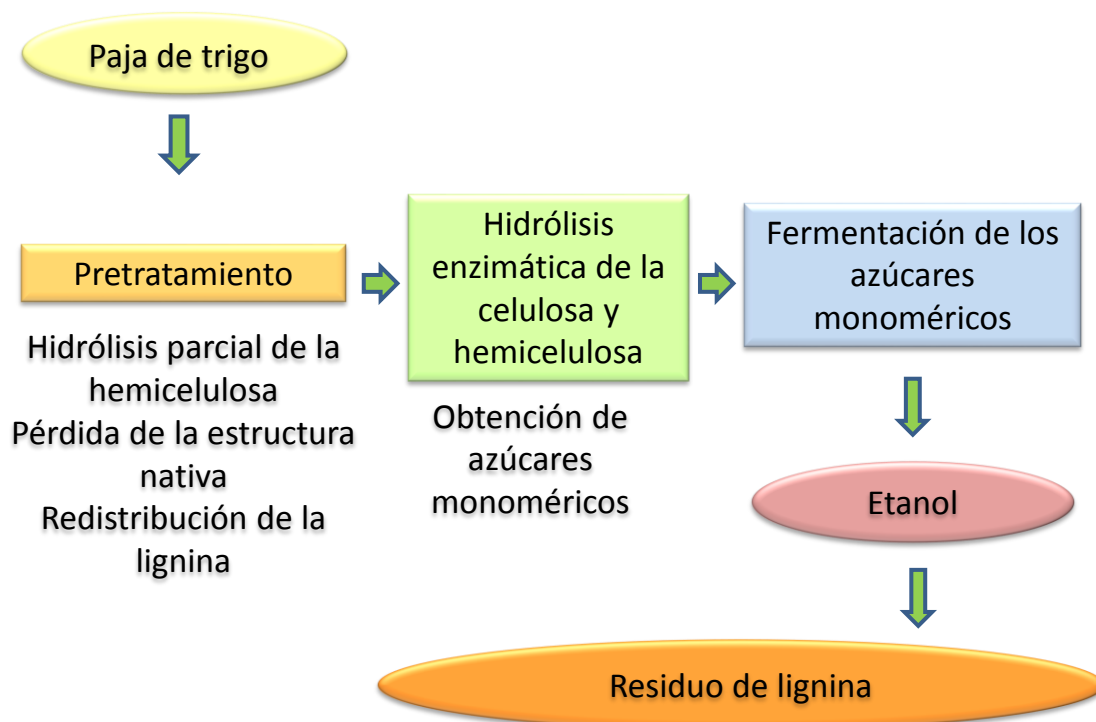


Figura 8. Esquema del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de trigo.

Un pretratamiento eficaz tiene que ser capaz de romper las uniones entre celulosa, hemicelulosas y lignina, contribuyendo a aumentar el área superficial accesible y el grado de porosidad del material pretratado. Además, el pretratamiento puede llegar a representar hasta un tercio del coste global del proceso de producción de bioetanol (Alvira y col., 2010). En este sentido, la eficiencia del pretratamiento se correlaciona directamente con la producción de un sustrato altamente digerible por la enzima con el mínimo gasto de energía.

Existen numerosos pretratamientos dirigidos a materiales lignocelulósicos descritos en la bibliografía que incluyen métodos físicos, químicos, físico-químicos y biológicos (Alvira et al., 2010; Mosier, et al, 2005; Hendriks y Zeeman, 2009). Algunos de ellos, aumentan el rendimiento de hidrólisis enzimática de una manera significativa, sin embargo, no todos son aplicables a escala industrial debido a altos costes o a las dificultades técnicas que conllevan. En cada caso debe evaluarse la idoneidad del tipo de pretratamiento a emplear, en función del tipo de materia prima, de la generación de inhibidores durante el mismo y del incremento del rendimiento de hidrólisis.

Entre los pretratamientos físicos, las técnicas de extrusión y molienda se están ensayando con buenos resultados (Talebnia y col., 2010). Estos pretratamientos tienen como objetivo principalmente la reducción de tamaño de partícula, lo que se traduce en una mayor digestibilidad.

Los métodos químicos emplean ácidos, bases y agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono). Todos estos catalizadores facilitan la eliminación de algún componente (p.ej. la eliminación de la lignina utilizando agentes alcalinos y oxidantes) o facilitan la solubilización e hidrólisis de los azúcares (agentes ácidos) (Talebnia y col., 2010). Estas tecnologías generan gran cantidad de compuestos inhibitorios que afectan las etapas posteriores y tienen un alto coste al requerir un mantenimiento e instrumental especial para evitar la corrosión de los equipos.

Los métodos físico-químicos combinan los dos tipos de métodos anteriores. Estos combinan diferentes condiciones de temperatura, presión, pH y contenido de humedad de la materia prima, pudiéndose añadir ácidos o bases diluidos, para conseguir solubilizar los diferentes componentes de la lignocelulosa (Mosier y col., 2005, Duque y col., 2013). En este grupo estaría incluida la explosión por vapor (con o sin catalizador ácido), la explosión por vapor con amoníaco (AFEX, del inglés Ammonia Fiber Explosion), el pretratamiento con agua caliente en fase líquida y la extrusión combinada con agentes químicos (extrusión reactiva).

Por último, los métodos biológicos se basan en la capacidad de algunos organismos (hongos y bacterias) para degradar la lignina y así aumentar la accesibilidad a la celulosa y hemicelulosas (Salvachúa y col., 2011). Este procedimiento no produce compuestos inhibidores y no genera subproductos dañinos para el medio ambiente, sin embargo, el lento crecimiento de alguno de estos organismos aumenta el tiempo global del proceso. Además, el consumo de glucosa requerido por los organismos para su crecimiento supone un problema para el rendimiento total de proceso.

1.4.1.1. Explosión por vapor

El pretratamiento por explosión por vapor puede ser utilizado en un amplio rango de materiales como paja y rastrojos de cereales como arroz y maíz, además de materiales herbáceos y maderas duras (Ballesteros y col., 2006). En el caso particular de la paja de trigo, éste es el pretratamiento más empleado.

En el pretratamiento por explosión por vapor, la paja de trigo se somete a la acción de vapor saturado a altas temperaturas y presión. Tras un tiempo de residencia determinado en el que el vapor de agua impregna el material lignocelulósico, se realiza una despresurización brusca que provoca la expansión repentina del vapor de agua dentro de la fibra, con la consecuente ruptura de las fibras lignocelulósicas. Además de la ruptura física de las fibras, se produce una reacción de autohidrólisis de las

hemicelulosas. Este proceso se debe a la solubilización de los grupos acetilo presentes en las hemicelulosas, los cuáles se transforman en ácido acético y provocan un descenso del pH en el reactor que provoca la ruptura parcial de los enlaces que constituyen las hemicelulosas. Las condiciones ácidas favorecen también la ruptura de los enlaces éter de la lignina y aunque la mayor parte se obtiene en forma insoluble, provoca la pérdida de su configuración nativa, reorganizándose en forma de pequeñas “gotas” en la superficie de la celulosa (Kristensen y col., 2008, Alvira y col., 2010).

En resumen, el pretratamiento por explosión por vapor provoca la desestructuración física de la fibra lignocelulósica, la solubilización de las hemicelulosas y la reorganización de la lignina aumentando la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Estudios previos han concluido que es un método muy eficiente para aumentar los rendimientos de hidrólisis enzimática de paja de trigo (Ballesteros y col. 2006, Alvira, Tesis Doctoral, 2011) y por ello ha sido el método elegido para pretratar la materia prima en la presente Tesis.

La principal desventaja de esta tecnología de pretratamiento es la generación de diferentes compuestos inhibidores derivados principalmente de la solubilización parcial de la lignina y de la degradación de azúcares. La severidad del pretratamiento por explosión por vapor es un factor clave que influye directamente en la concentración de estos compuestos inhibidores. El factor de severidad se define como el efecto combinado de la temperatura y la duración del tratamiento (Agbor y col., 2011). Unas condiciones más severas de pretratamiento implican una mayor alteración de la estructura nativa de la lignocelulosa, lo que se traduce en una mayor accesibilidad por parte de las enzimas celulolíticas a la fibra de celulosa y por tanto mayores rendimientos de hidrólisis enzimática. No obstante, también se aumenta la degradación de los azúcares y de la lignina, provocando una pérdida de azúcares potencialmente fermentables y un aumento en la concentración de inhibidores. En este contexto, dada la estrecha relación que existe entre las condiciones a las que se realiza el pretratamiento y la formación de compuestos inhibidores, es imprescindible llegar a unas condiciones de compromiso en las que se obtenga unos buenos rendimientos de hidrólisis enzimática con la menor generación de compuestos inhibidores posible. Estos compuestos se pueden clasificar atendiendo a su naturaleza en derivados del furano, ácidos alifáticos y derivados fenólicos. Los derivados del furano son principalmente el 2-furaldehído (furfural) y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Estos compuestos provienen de la descomposición parcial de las pentosas y hexosas, respectivamente. Los ácidos

alifáticos que se generan son mayoritariamente los ácidos acético, fórmico y levulínico. El ácido acético se produce durante la solubilización de los grupos acetilos de las hemicelulosas. Por otra parte, los ácidos fórmico y levulínico provienen de la descomposición del furfural e 5-HMF (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000, Panagiotou y Olson, 2007). Por último, la solubilización parcial de la lignina libera una gran variedad de compuestos fenólicos como el siringaldehído, la vainillina, el ácido ferúlico, el ácido ρ -cumárico, etc. (Figura 9).

Durante la fermentación, los ácidos alifáticos en su forma no disociada pueden transfundir a través de las membranas plasmáticas de las levaduras y una vez en el citoplasma disociarse. Este proceso produce una acumulación intracelular de protones que provoca una alteración del pH intracelular (Yang y col., 2010). Esta alteración provoca una respuesta celular con la finalidad de mantener el equilibrio del pH interior activando un mecanismo de transporte de protones hacia el exterior. Este mecanismo de regulación provoca un desequilibrio en los niveles energéticos de la célula, debido a que el transporte de protones se realiza mediante bombas dependientes de ATP (Almeida y col., 2007). Cuando las concentraciones de ácidos en forma no disociada son elevadas, se supera la capacidad de bombeo de protones, lo que provoca acidificación del citoplasma. De esta manera, los ácidos alifáticos provocan la inhibición en el crecimiento celular e incluso la muerte del organismo fermentativo.

Los derivados del furano reducen los niveles de NAD(P)H afectando el poder reductor. Se ha observado que en presencia de furfural existe una acumulación de intermediarios metabólicos de la ruta de las pentosas fosfato, debido a la inhibición de varias enzimas implicadas en dicha ruta (Gorsich y col., 2006). Esta ruta no degradativa juega un papel importante en el equilibrio NADPH/NADP intracelular y por lo tanto, la inhibición de esta ruta por parte de los derivados del furano provoca un desequilibrio en el flujo de cofactores reducidos, esenciales para la síntesis de lípidos y ácidos nucleicos.

Los compuestos fenólicos pueden afectar tanto a la hidrólisis enzimática como a la fermentación. Los compuestos fenólicos pueden inhibir o desactivar las enzimas hidrolíticas al establecer interacciones con ellas (Ximenes y col., 2010, 2011). Además estos compuestos inducen la formación y acumulación de radicales libres del oxígeno (ROS) alterando la integridad de las membranas celulares, orgánulos y cromatina (Nguyen y col., 2014) lo que afecta negativamente al crecimiento del microorganismo.

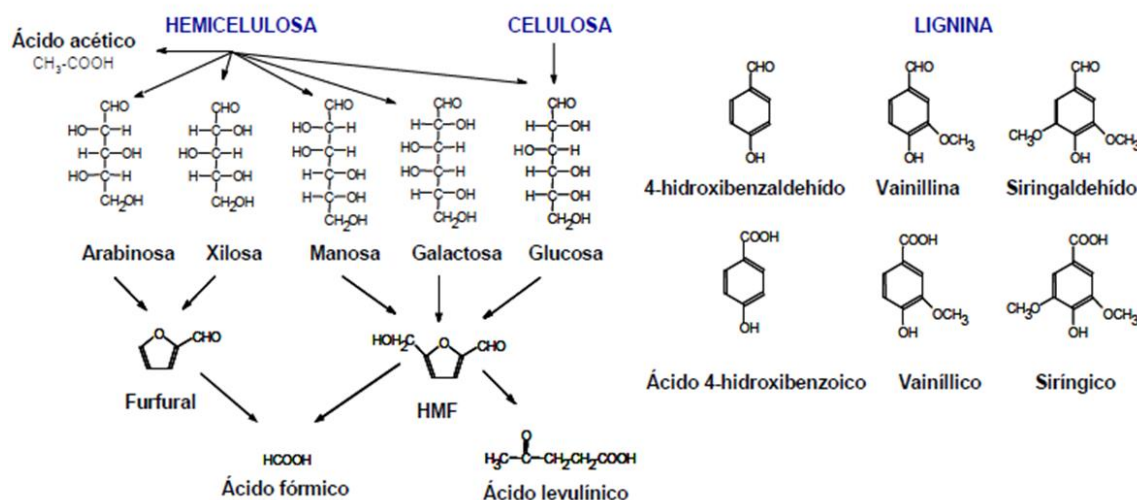


Figura 9. Principales productos de degradación originados tras explosión por vapor de paja de trigo. Adaptado de Tomás-Pejó, 2010, Tesis Doctoral.

1.4.2. Hidrólisis enzimática

El objetivo de esta etapa es la hidrólisis de la celulosa y las hemicelulosas hasta sus correspondientes monosacáridos. Debido a la complejidad de la composición de los materiales lignocelulósicos, para una eficiente hidrólisis de los polisacáridos se requieren diversas enzimas hidrolíticas. En este sentido, es necesario el empleo de complejos enzimáticos que contengan una mezcla de actividades enzimáticas adecuada al tipo de material.

Las enzimas que participan en la degradación de la celulosa se denominan con el nombre genérico de celulasas, siendo esencial la participación sinérgica de tres tipos de celulasas. Las endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4) hidrolizan los enlaces glucosídicos internos β -(1-4) de forma aleatoria; las celobiohidrolasas o exoglucanasas degradan la cadena de celulosa a partir del extremo reductor (CBH I, EC 3.2.1.176) y del extremo no reductor (CBH II, EC 3.2.1.91) y las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) hidrolizan el enlace β -(1-4) del producto de las CBH, la celobiosa, liberando dos moléculas de glucosa (Jørgensen y col., 2007, Horn y col., 2012).

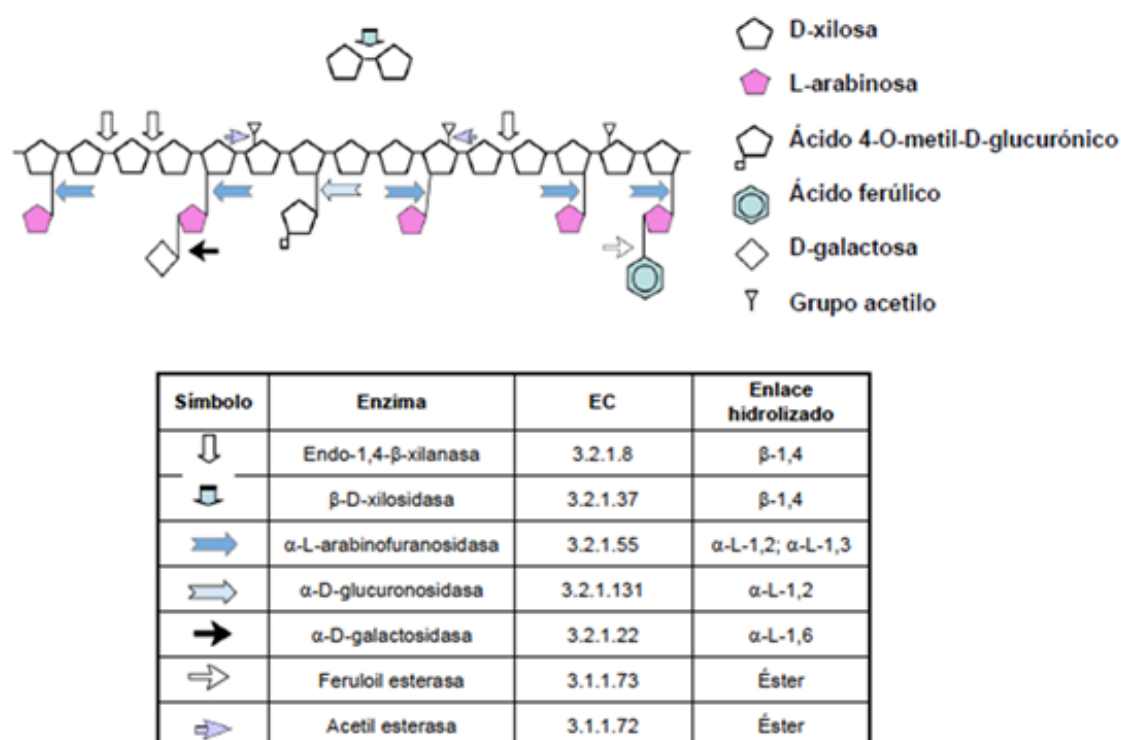


Figura 10. Enzimas implicadas en la degradación de glucuronoarabinoxilano, componente mayoritario de las hemicelulosas en la paja de trigo. Adaptado de Moreno, 2013, Tesis Doctoral.

En el caso de las hemicelulosas, al tratarse de un polímero mucho más heterogéneo se requiere un grupo más complejo de enzimas con diferentes actividades. Las enzimas implicadas en la hidrólisis de su cadena principal de xilano son las endoxilanasas y las β-xilosidasas. Sin embargo, para una completa hidrólisis de las hemicelulosas de paja de trigo se requieren otras actividades como las arabinofuranosidasas, galactosidasas, glucuronidasas, acetil esterassas, feruoil esterassas y *p*-cumaroil esterassas (Polizeli y col. 2005) (Figura 10).

Para facilitar la eficiencia de todas estas enzimas, en ocasiones se suelen añadir enzimas ligninolíticas, expansinas o polisacárido-monoxigenasas. Estas enzimas degradan parcialmente la lignina (ligninolíticas), generan microporos entre las fibras (expansinas) o extremos reductores para las CBH (polisacárido-monoxigenasa), lo que provoca un aumento del área de contacto de las enzimas hidrolíticas con los polisacáridos (Brotman y col., 2008, Horn et al., 2012) (Figura 11).

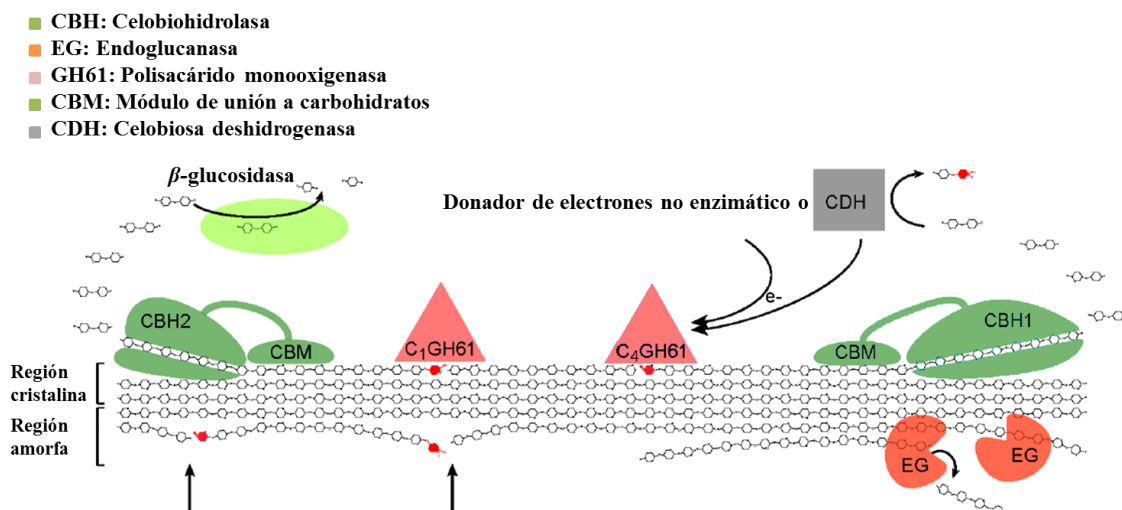


Figura 11. Esquema simplificado de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Adaptado de Horn y col., 2012.

1.4.3. Fermentación

El proceso de fermentación consiste en la producción de etanol a partir de los azúcares liberados durante la etapa de hidrólisis enzimática. A nivel industrial, la fermentación se realiza principalmente utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* debido a que puede utilizar todo tipo de hexosas y produce etanol con rendimientos cercanos al teórico. Teniendo en cuenta la estequiometría del conjunto de reacciones metabólicas que conllevan la transformación de hexosas y pentosas a etanol, el rendimiento teórico para ambos es de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar. No obstante, en la práctica es muy difícil alcanzar este rendimiento puesto que las levaduras derivan parte del consumo de esqueletos carbonados hacia el crecimiento y el metabolismo celular.

La integración de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación, conocida como estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), resulta muy apropiada puesto que la glucosa que se va liberando se consume al mismo tiempo por el microorganismo fermentador disminuyéndose la inhibición por producto final que la glucosa ejerce sobre las celulasas. De ese modo se obtienen mejores rendimientos de etanol y se reduce el tiempo global del proceso. Sin embargo, las condiciones óptimas de temperatura en la hidrólisis enzimática son en torno a los 50 °C y el óptimo de temperatura para *S. cerevisiae* es de 30-37 °C (Olsson y col., 2005). Esta diferencia de óptimos de temperatura dificulta la integración de la etapa de hidrólisis y fermentación,

debido a que el proceso se tendría que llevar a temperaturas muy inferiores del óptimo las enzimas hidrolíticas. Por otro lado, si se realiza la hidrólisis separada de la fermentación, denominado hidrólisis y fermentación separadas (HFS), se seleccionan las condiciones adecuadas para cada etapa. Además de la inhibición por producto final mencionada anteriormente, otra desventaja de realizar los procesos por separado sería el elevado coste energético requerido al tener que enfriar el hidrolizado obtenido tras la primera etapa, con el consiguiente riesgo de contaminación del hidrolizado al tener que transvasar todo el material. En este contexto, el uso de levaduras termotolerantes que sean capaces de fermentar a temperaturas superiores a 40 °C puede facilitar la integración de las etapas de sacarificación y fermentación. Además, se reducirían los riesgos de contaminación y se disminuirían los costes de refrigeración de los reactores, favoreciendo la eficiencia del proceso de SFS (Hasunuma y Kondo, 2012).

Entre las levaduras termotolerantes las pertenecientes al género *Kluyveromyces*, y más concretamente la especie *Kluyveromyces marxianus*, son muy interesantes para su aplicación en procesos biotecnológicos. *K. marxianus* tiene un crecimiento extremadamente rápido con tiempos de generación de unos 70 min, tiene la capacidad para asimilar diferentes fuentes de carbohidratos como la lactosa e inulina, muestra habilidad de crecimiento hasta temperaturas de 52 °C y alta capacidad secretora (Lane y col., 2010; Fonseca y col., 2008). Debido a estas características, esta levadura se ha empleado tanto para la producción de enzimas como en procesos de producción de etanol (Rocha y col., 2010; Nonklang y col., 2008). Ballesteros y col. (2004) emplearon la cepa *K. marxianus* CECT 10875 en procesos de SFS de paja de trigo pretratada por explosión por vapor, alcanzando un rendimiento final del 62% del teórico en 82 h de proceso. Asimismo, Tomás-Pejó y col. (2009) alcanzaron una concentración de etanol cercana a la mínima requerida en un proceso industrial (4% (p/v)) utilizando esta misma cepa, en una configuración de SFS en semicontinuo con paja de trigo pretratada mediante explosión por vapor. En este contexto, el empleo de *K. marxianus* CECT 10875 representa una alternativa prometedora en el proceso de producción de etanol a partir de paja de trigo. Sin embargo, como desventaja cabe mencionar que el aumento de la temperatura de proceso provoca una mayor fluidez de las membranas de la célula, lo que conlleva una mayor susceptibilidad de estos microorganismos frente a los inhibidores derivados del pretratamiento, limitando de esta forma su uso (Tomás-Pejó y col., 2009).

1.4.4. Procesos de destoxificación

Una alternativa para mejorar la fermentabilidad del material pretratado es reducir los compuestos inhibidores presentes en el prehidrolizado. Con este objetivo se han desarrollado numerosos métodos de destoxificación, entre los que se incluyen métodos físicos (filtración, evaporación, separación por membranas), químicos (neutralización, ‘overliming’, carbón activado, resinas de intercambio iónico y extracción con etil acetato) y biológicos (destoxificación con microorganismos y/o enzimas). No todas las metodologías de destoxificación son capaces de eliminar completamente todos los inhibidores, y la presencia de un tipo de inhibidor u otro puede variar el grado de inhibición del prehidrolizado dependiendo del microorganismo fermentador que se emplee (Musatto y Roberto, 2004). Además, la composición de los compuestos inhibidores en el prehidrolizado es dependiente del tipo de biomasa y el pretratamiento que se elija.

1.4.4.1. Métodos físicos

Entre los distintos métodos físicos de destoxificación, los procesos de filtración y lavado son las tecnologías más empleadas a nivel industrial. Sin embargo, estos métodos conllevan la pérdida de azúcares solubles potencialmente fermentables, un aumento en el gasto del agua y generación de aguas contaminadas (Moreno y col., 2015). Otros sistemas físicos de destoxificación son la evaporación y la separación por membranas. El método de evaporación en vacío permite eliminar compuestos volátiles tales como ácido acético, furfural y vainillina. No obstante, no es capaz de eliminar otros compuestos tóxicos como los extractivos y otros compuestos fenólicos. La evaporación se ha empleado para destoxificar diversos prehidrolizados de diferentes materiales lignocelulósicos pretratados como píceas, eucalipto y rastrojo de maíz (Larsson y col., 1999; Converti y col., 2000; Zhu y col., 2011).

El método de separación por membranas consiste en bombear el prehidrolizado a través de membranas que poseen en sus microporos grupos funcionales que mediante un mecanismo de adsorción pueden eliminar ciertos compuestos inhibidores. Este método es útil para eliminar ácidos alifáticos (Greznia y col., 2010). Sin embargo, estos métodos tienen como principal desventaja el empleo y mantenimiento de equipamiento adicional lo que implicaría un aumento en el coste del proceso.

1.4.4.2. Métodos químicos

Entre los diferentes métodos de destoxificación química, cabe destacar la neutralización alcalina por hidróxido de calcio ('overliming'). Este método combina unas condiciones de pH alcalino y temperatura alta. Actualmente, se considera un método de destoxificación prometedor para prehidrolizados procedentes de biomasa pretratada por ácido diluido o por explosión por vapor (Chandel y col. 2011a). Debido a la liberación de los grupos acetilo presentes en las hemicelulosas de herbáceas y cereales, los prehidrolizados obtenidos presentan una naturaleza ácida. La adición de hidróxido de calcio permite aumentar el pH, y este cambio de pH del prehidrolizado reduce significativamente el contenido en derivados del furano y compuestos fenólicos (Chandel y col., 2011b). Este método no es capaz de eliminar el ácido acético y además presenta como desventaja que el pH obtenido tras el tratamiento es superior al óptimo para la fermentación.

Otros métodos de destoxificación química empleados son el tratamiento por carbón activado o resinas de intercambio iónico (Canilha y col., 2008; Chandel y col., 2007). Estos métodos, aunque son altamente efectivos a la hora de eliminar selectivamente parte de los compuestos inhibidores, presentan como principal desventaja el empleo equipamiento adicional y químicos específicos que incrementan el coste global del proceso.

1.4.4.3. Métodos biológicos (biodestoxificación)

Los métodos biológicos de destoxificación o biodestoxificación implican la utilización de microorganismos capaces de asimilar y degradar los compuestos inhibidores o la adición de enzimas que catalicen la eliminación de dichos compuestos. En este contexto, la etapa de biodestoxificación se puede llevar a cabo como una etapa previa a la fermentación o conjuntamente con ella.

Los microorganismos mayoritariamente empleados son los hongos filamentosos, siendo el hongo *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) el más estudiado. Este hongo, además de ser un gran secretor de celulasas, tiene la capacidad de metabolizar ciertos componentes tóxicos del prehidrolizado. Palmqvist y col. (1997) observaron una reducción en la fracción fenólica, así como en los derivados del furano y ácidos alifáticos, al tratar con *T. reesei* el prehidrolizado de sauce pretratado por explosión por vapor, mejorando la productividad volumétrica y los rendimientos de producción de

etanol. Otros autores han utilizado otras especies de hongos como *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 o *Amorphotheca resinae* ZN1 que fueron capaces de reducir los compuestos tóxicos presentes en el prehidrolizado de rastrojo de maíz, arroz, paja de trigo y paja de colza (Nichols y col., 2010; Zhan y col., 2010).

Los procesos de biodestoxificación con hongos se han realizado habitualmente sobre el prehidrolizado o fracción líquida. No obstante, su aplicación sobre el material pretratado completo (MPC) puede presentar ventajas ya que estos hongos no son sólo capaces de metabolizar los compuestos tóxicos sino también de secretar enzimas hidrolíticas. De esta manera, su uso supondría que a la vez que se produce la biodestoxificación, se secretan enzimas hidrolíticas, disminuyendo así la dosis de enzimas añadidas externamente (Yu y col., 2011). Por otra parte, algunos hongos presentan a su vez capacidad lignilítica y hemicelulolítica, por lo que su empleo no sólo eliminaría inhibidores sino que permitiría un cierto grado de deslignificación del MPC lo que se traduciría en mejores rendimientos de hidrólisis enzimática.

Aunque su uso ha sido menos estudiado, algunas bacterias tienen capacidad para metabolizar los diferentes compuestos inhibidores. Okuda y col. (2008) utilizaron la bacteria termófila *Ureibacillus thermophaercus* para eliminar el furfural y el 5-HMF de un medio sintético, así como los diferentes compuestos fenólicos presentes en un hidrolizado de madera.

El empleo de hongos y bacterias para la biodestoxificación de prehidrolizados es una alternativa interesante al ser mucho menos costosa y más sostenible ya que no se emplean ni generan productos agresivos y contaminantes. Sin embargo, la principal desventaja es el consumo de azúcares por parte de los microorganismos, reduciendo la cantidad de etanol potencialmente alcanzable.

Para evitar el consumo de azúcares por parte de los microorganismos encargados de la destoxificación ajenos al proceso de fermentación, la destoxificación puede llevarse a cabo *in situ* mediante el uso directo de microorganismos fermentadores ya que algunos de ellos poseen la habilidad natural para eliminar ciertos compuestos inhibidores. *S. cerevisiae* puede convertir los derivados del furano y ciertos compuestos fenólicos en sus respectivos alcoholes (Ferreira y col., 2011). Thomsen y col. (2009) observaron la capacidad de *S. cerevisiae* para destoxificar hidrolizados provenientes de paja de trigo pretratada, reduciendo la concentración de furfural y fenoles. La principal desventaja que tiene esta metodología es la necesidad de emplear altas dosis de inóculo ya que la gran concentración de tóxicos en el prehidrolizado ejerce un fuerte efecto

inhibidor sobre la levadura, prolongando la fase de adaptación al medio y alargando el tiempo total del proceso.

1.4.4.3.1. Métodos enzimáticos

Como alternativa a los procesos de biodegradación microbianos, los procesos de detoxificación enzimáticos representan una de las opciones más atractivas y han sido ampliamente estudiados para disminuir la toxicidad de los materiales pretratados. De forma similar a los tratamientos biológicos, el uso de enzimas no requiere la adición de químicos potencialmente dañinos para el medio ambiente y no produce subproductos contaminantes. Además, no conlleva consumo de azúcares, reduce los tiempos de reacción e incrementa la eficiencia de la reacción al realizarse en condiciones óptimas de pH (3-8) y temperatura para las enzimas hidrolíticas (25-80°C) (Moreno y col., 2015). Asimismo, el uso de enzimas también añade la posibilidad de integrar mejor la etapa de detoxificación junto con la hidrólisis enzimática si los óptimos de temperatura y pH de ambas enzimas, detoxificantes e hidrolíticas, son similares (Moreno y col., 2012a).

Las enzimas más comúnmente empleadas para la detoxificación enzimática de los materiales lignocelulósicos pretratados han sido las enzimas ligninolíticas, tales como las lacasas y las peroxidasas fúngicas, provenientes de diferentes basidiomicetos de la podredumbre blanca como *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Cerrenia unicolor*, *Coriolopsis rigida*, etc. (Jönsson y col., 1998; Moreno y col., 2012b, 2013a; Moilanen y col., 2011; Jurado y col., 2009).

1.4.4.3.2. Peroxidasas ligninolíticas

Este grupo de enzimas engloba un conjunto de hemoperoxidasas de alto potencial redox que requieren ser activadas por peróxido de hidrógeno para llevar a cabo las oxidaciones de una gran variedad de compuestos. Estas enzimas se clasifican en cuatro grupos: lignina peroxidasas (LiP, EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (MnP, EC 1.11.1.13), peroxidasas versátiles (PV, EC 1.11.1.16) y las peroxidasas decoloradoras de tintes (DyP, EC 1.11.1.19).

Las LiP y las MnP fueron descritas inicialmente en el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Wong, 2009). Las LiP tienen un alto potencial redox y pueden oxidar en presencia de H₂O₂ tanto las unidades no fenólicas como las fenólicas de la lignina,

así como un amplio rango de compuestos con un potencial redox mayor de 1,4 V. Las MnP requieren Mn^{2+} para cerrar su ciclo catalítico y oxidan fundamentalmente compuestos fenólicos, aunque pueden también oxidar compuestos no fenólicos a través de otros intermediarios (Hofrichter, 2002).

Las PV se identificaron en una cepa de *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Dueñas y col., 2001). Al principio se describieron como MnP capaces de oxidar sustratos no fenólicos típicos de la LiP, pero después se reclasificaron en un grupo nuevo de peroxidasas fúngicas que compartían las propiedades catalíticas de las LiP y MnP (Camarero y col., 1999).

Por último, las DyP se han descrito como un tipo especial de peroxidasas que no oxidan Mn^{2+} pero que degradan tanto compuestos fenólicos como no fenólicos, así como algunos colorantes de tipo antraquinona que no son degradados por las LiP ni las PV (Liers y col., 2013).

Debido a su capacidad para oxidar un amplio rango de compuestos fenólicos, derivados aromáticos, compuestos no fenólicos, pesticidas, xenobióticos y colorantes recalcitrantes, estas enzimas han sido ampliamente estudiadas y empleadas en procesos de destoxificación de efluentes y en procesos de deslignificación (Bansal y col., 2013; Salvachúa y col., 2013). Sin embargo, la dependencia de H_2O_2 como aceptor de electrones para completar el ciclo de oxidación, requiere la adición externa del H_2O_2 o la participación de otras enzimas auxiliares involucradas en la producción de H_2O_2 , tales como aril-alcohol oxidasa, glioxal oxidasa, etc. Este requerimiento imprescindible para mantener el flujo redox, dificulta el uso directo de estas enzimas en procesos industriales.

1.4.4.3.3. Lacasas

Las lacasas son oxidasas multicobre que catalizan la oxidación de fenoles, anilinas y tioles aromáticos a sus correspondientes radicales utilizando como aceptor final el oxígeno, el cual es reducido a agua (Thurson, 1994). Debido a que estas enzimas no precisan de H_2O_2 para completar su ciclo redox, las lacasas representan una opción muy prometedora en los procesos de biodestoxificación enzimática de materiales lignocelulósicos pretratados. Las lacasas representan uno de los grupos más antiguos de enzimas descubiertas y descritas (Yoshida, 1883). Estas son producidas por algunas plantas, bacterias, basidiomicetos de la podredumbre blanca y algunos deuteromicetos ascomicetos y desde su descubrimiento, sus aplicaciones biotecnológicas han ido

creciendo. Estas enzimas se han aplicado para eliminar diversos xenobióticos y colorantes en efluentes, procesos de biorremediación, deslignificación y blanqueamiento de pulpas para papel, destoxificación de prehidrolizados así como polimerización y generación de nuevos compuestos para diversas aplicaciones (Luisa y col. 1996; Wang y col., 2002; Ibarra y col., 2006; Jeon y col., 2010; Moreno y col., 2012a).

Las lacasas pueden ser enzimas diméricas o tetraméricas glicosiladas que contienen 4 átomos de cobre (Cu^{2+}) por monómero, e independientemente del microorganismo que las produzca, las lacasas presentan un centro activo altamente conservado (Dwivedi y col., 2011). Este centro activo se subdivide en tres tipos de centros metálicos; tipo 1, tipo 2 y tipo 3 o centro binuclear (Solomon y col., 1993) de acuerdo con sus propiedades geométricas, ópticas y electrónicas (Figura 12). El átomo de cobre del tipo 1 se encuentra ligado a dos histidinas, una cisteína y una metionina, lo que forma una estructura trigonal. Este centro muestra una intensa absorción electrónica en la banda cercana a los 600 nm, el cual es responsable del típico color azul de la enzima. El átomo del tipo 2 se encuentra ligado a dos histidinas, es típico de los iones cobre en complejos tetragonales. El centro binuclear 3 presenta dos átomos de cobre coordinados con tres histidinas cada uno y un puente hidroxilo el cual mantiene unidos a los átomos de cobre. El centro del tipo 3 absorbe a 330 nm, esa propiedad óptica es característica de las lacasas amarillas. El centro de tipo 2 tiene un espectro de resonancia paramagnética electrónica característico, muy distinto del tipo 1, mientras el centro tipo 3 es silencioso. Dependiendo de las propiedades electrónicas de los tres centros activos, las lacasas se pueden dividir en dos grupos, lacasas de alto potencial redox y lacasas de bajo potencial redox. Las lacasas fúngicas, especialmente las de hongos de la podredumbre blanca, son lacasas de alto potencial redox, mientras las lacasas bacterianas y de plantas son ejemplos de lacasas de bajo potencial redox (Mikolasch y col., 2009).

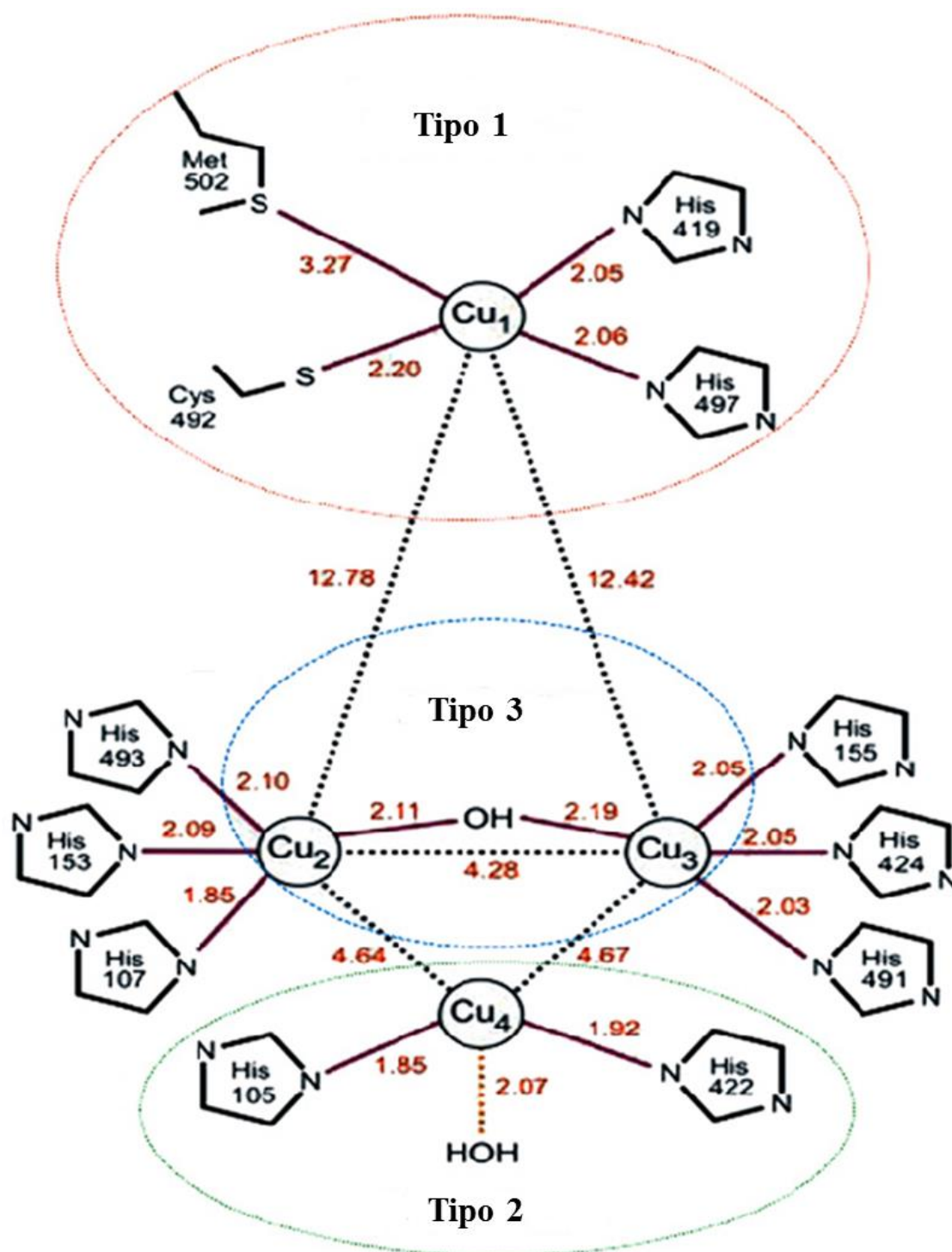


Figura 12. Representación esquemática del centro activo de la lacasa. Adaptado de Dwivedi y col., 2011.

Las lacasas catalizan la sustracción de un electrón del grupo hidroxilo del compuesto fenólico, formando sus correspondientes radicales fenoxilo los cuales forman compuestos de mayor peso molecular mediante un mecanismo de polimerización oxidativa (Ghoul y Chebil, 2012). Aunque las lacasas no pueden actuar

sobre los compuestos no fenólicos y compuestos fenólicos de elevado potencial redox, se ha observado, que en presencia de diferentes mediadores naturales como ciertos fenoles presentes en el prehidrolizado, las lacasas pueden terminar por oxidar estos compuestos (Cañas y Camarero, 2010) (Figura 13).

1.4.4.3.3.1. Lacasas en plantas

La lacasa de planta mejor caracterizada y estudiada es la producida por la anacardiácea *Toxicodendron vernicifluum* (*Rhus vernicifera*), aunque también se han detectado lacasas en frutales (mango, melocotón, ciruelo), coníferas (*Pinus taeda*), frondosas (*Populus trichocarpa*), así como en algunas herbáceas (*Lolium perenne*, *Zea mays*). Las lacasas de las plantas pertenecen a una familia multigénica, de hecho, se han encontrado hasta ocho lacasas en *P. taeda* y cinco lacasas distintas en el xilema de *P. trichocarpa*. Estas lacasas presentan un alto grado de glicosilación (22-45%) y un mayor peso molecular en comparación con las lacasas fúngicas. La alta glicosilación representa un papel esencial en la secreción, retención de cobre, estabilidad térmica y actividad enzimática (Xu y col., 1999). Las lacasas desarrollan diferentes funciones en las plantas, tales como la polimerización de la lignina mediante un mecanismo de “radical coupling” (Sterjiades y col., 1992), procesos de cicatrización y la oxidación de hierro (McCaig y col., 2005).

1.4.4.3.3.2. Lacasas bacterianas

La primera lacasa bacteriana descrita se encontró en *Azospirillum lipoferum*, asociada a la rizosfera de herbáceas y cereales. Esta enzima estaba implicada en formación de melanina (Faure y col., 1995). También se detectó actividad lacasa en la cianobacteria *Anabaena azollae*, en *Bacillus subtilis* y en dos especies del género *Streptomyces* (Malliga y col., 1996; Martins y col., 2002; Arias y col., 2002; Suzuki y col., 2003). Al contrario de la mayoría de las lacasas fúngicas y de plantas, muchas de las lacasas bacterianas son intracelulares, altamente activas y más estables a altas temperaturas y pH elevados (McMahon y col., 2007).

1.4.4.3.3.3. Lacasas fúngicas

Las lacasas están ampliamente distribuidas en hongos, siendo producidas tanto por ascomicetes, deuteromicetes y basidiomicetes (Dwivedi y col., 2011). Entre los

ascomicetes denominados saprófitos se encuentran *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Chaetomium thermophile*. También producen lacasas otros basidiomicetos saprófitos del género *Agaricus* y *Marasmius*. Aunque los mayores productores de lacasas son los hongos basidiomicetos del orden poliporales, comúnmente denominados hongos de la podredumbre blanca de la madera, como *T. versicolor*, *T. villosa*, *P. cinnabarinus*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus eryngii*, etc. Las lacasas fúngicas también presentan un alto grado de glicosilación (10-25%) aunque menor comparado con las lacasas de plantas. Todas las lacasas fúngicas muestran una estructura semejante, consistente en tres dominios de tipo barril- β secuencialmente dispuestos de forma similar a proteínas azules cobre, como la plastocianina y la azurina (Wong, 2009). El papel de la lacasa en todos estos hongos degradadores de madera es el de despolimerizar la lignina de las paredes celulares de las plantas. Este proceso de degradación también implica la participación sinérgica con otras enzimas ligninolíticas como las LiP, MnP y enzimas oxidoreductasas como quinona reductasa. A parte de su papel en el proceso de deslignificación de las paredes celulares, también participan en otras funciones como pigmentación, formación de esporas, fructificación, destoxificación y patogénesis. Se ha observado que los hongos patógenos de plantas secretan lacasas para destoxificar los distintos componentes tóxicos generados por el sistema de defensa de la planta (Langfelder y col., 2003).

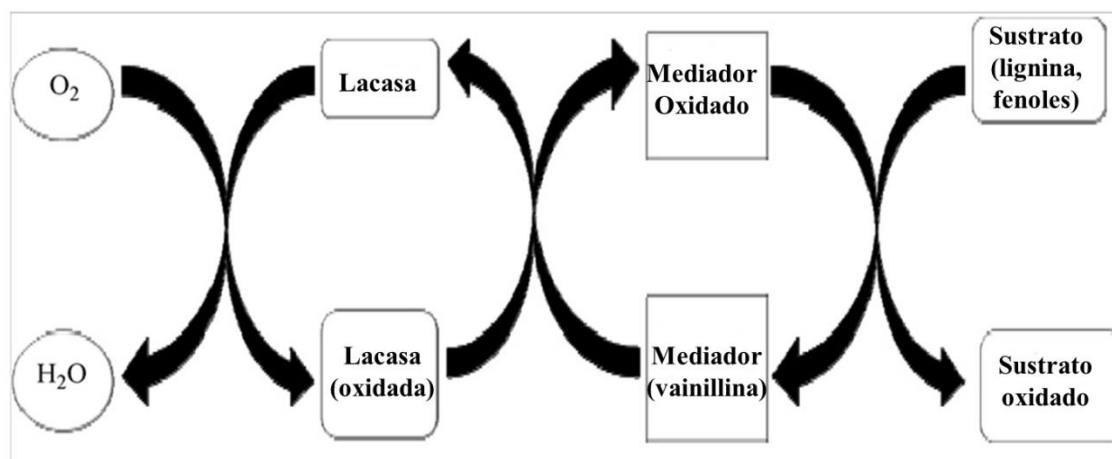


Figura 13. Representación esquemática del proceso de catálisis de la lacasa en presencia de mediador. Adaptado de Dwivedi y col., 2011.

1.4.5. Lacasas fúngicas en procesos de biodestoxificación de materiales lignocelulósicos pretratados

La capacidad, por parte de las lacasas fúngicas, de oxidar los compuestos fenólicos generados en el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, permitiría reducir la concentración de inhibidores aumentando la fermentabilidad de los medios. En este contexto, Jurado y col. (2009) emplearon dos lacasas procedentes de los hongos *C. unicolor* y *T. villosa* para destoxificar paja de trigo pretratada por explosión por vapor en presencia y ausencia de ácido. En ambos casos, se observó una reducción de entre el 70-75% en el contenido fenólico lo que se tradujo en una mejora en la fermentabilidad de los hidrolizados. Por otra parte, Moreno y col. (2012b) compararon la viabilidad celular de *S. cerevisiae* “Ethanol Red” y *K. marxianus* CECT 10875 en procesos de SFS a temperaturas de 35 °C y 42 °C respectivamente, utilizando el MPC por explosión por vapor de paja de trigo en presencia de lacasa de *P. cinnabarinus*. En ambos casos, el tratamiento con lacasa permitió mejorar la fermentabilidad del MPC. En el caso de *S. cerevisiae*, el tratamiento con lacasa redujo la fase de latencia de la levadura. En el caso de *K. marxianus*, la adición de lacasas fue imprescindible para conseguir la fermentación de los medios y alcanzar concentraciones similares a los obtenidos por *S. cerevisiae*.

La elección de la lacasa a utilizar en los procesos de destoxificación depende en cierta manera del tipo de configuración del proceso que se vaya a aplicar. En este contexto, el tratamiento con lacasas se puede realizar previamente o conjuntamente a las otras etapas del proceso. Sin embargo, con el objetivo de reducir el tiempo total del proceso, la realización de la etapa de destoxificación con lacasas conjuntamente a la etapa de hidrólisis enzimática sería la configuración más adecuada. En este contexto, sería deseable la elección de una lacasa con óptimos de temperatura y pH cercanos a los de las enzimas hidrolíticas.

Las lacasas de *T. versicolor* y *T. villosa* son las más empleadas en estos procesos al ser lacasas de alto potencial redox, no obstante, su óptimo de temperatura es 35 °C, lo que dificultaría su acción conjunta con la hidrólisis enzimática. La lacasa procedente del hongo *P. cinnabarinus* puede ser una alternativa interesante, debido a que posee un óptimo de oxidación de 50 °C, además de un alto potencial redox y un pH óptimo de 4 (Eggert y col., 1996). La lacasa del ascomiceto *M. thermophila* también puede considerarse una opción interesante para la destoxificación de MPC. Esta lacasa

de bajo potencial redox tiene un pH óptimo ligeramente superior al de las enzimas hidrolíticas (Berka y col., 1997), presenta una temperatura óptima de 50 °C y está disponible comercialmente (Novozymes).

1.5. INTEGRACIÓN DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO

Las condiciones a las que se realiza cada etapa del proceso de producción de bioetanol lignocelulósico tienen una gran influencia sobre las demás. En este contexto, la integración de las etapas debe optimizarse para que el proceso se lleve a cabo de la forma más eficiente posible favoreciendo rendimientos altos de hidrólisis y fermentación sin incrementar la inversión en equipamiento. En nuestro caso, tras el pretratamiento por explosión por vapor se obtiene un material pretratado completo (MPC). El MPC está compuesto por una fracción de residuo sólido insoluble (RSI) rica en celulosa y lignina, y una fracción líquida o prehidrolizado que contiene los azúcares hemicelulósicos parcialmente hidrolizados por el pretratamiento y los compuestos inhibidores. Debido a la presencia de estos inhibidores, el MPC se suele filtrar y lavar para separar las dos fracciones y utilizar exclusivamente el RSI en el proceso de producción de etanol. Al utilizar en RSI no se aprovechan los azúcares potencialmente fermentables presentes en la fase líquida y se incrementa la cantidad de agua empleada en el proceso. En este sentido, la utilización directa del MPC supondría una reducción de los costes operacionales al evitar una etapa de filtración y lavado previa. Además, se reduciría el uso de agua y se facilitaría el uso en la etapa de fermentación de los azúcares solubles obtenidos en el pretratamiento (Tomás-Pejó y col., 2009). No obstante, para conseguir una utilización eficiente del MPC, es necesaria una reducción de la concentración de inhibidores y utilizar a su vez microorganismos con elevada tolerancia a estos compuestos. En este contexto, los sistemas de biodestoxificación *in situ* con lacasas representarían una alternativa prometedora para mejorar los rendimientos del proceso de producción de etanol lignocelulósico.

Las etapas de producción de enzimas, hidrólisis y fermentación pueden realizarse de diferentes maneras dando lugar a diferentes configuraciones: hidrólisis y fermentación separadas (HFS), sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) o bioproceso consolidado (BPC) (Cardona y col., 2010). La integración de las etapas en diferentes configuraciones significa tener una visión global del pretratamiento,

hidrólisis y fermentación, ya que cada uno de estos pasos tiene una importante repercusión en el siguiente.

1.5.1. Hidrólisis y fermentación separada (HFS)

En la estrategia de HFS, las etapas de hidrólisis y fermentación se realizan separadamente en dos reactores a unas condiciones de pH y temperatura óptimas para cada etapa. En esta configuración, la fracción sólida insoluble generada tras la hidrólisis enzimática pueda ser retirada fácilmente, lo que permite que la etapa de fermentación se realice en un medio líquido y por tanto se puedan reutilizar los microorganismos fermentadores (Olsson y col., 2005). La principal desventaja de esta configuración es la inhibición de las enzimas hidrolíticas por producto final, ya que la celobiosa y la glucosa actúan como inhibidores de las celulasas, lo que disminuye los rendimientos del proceso (Olsson y col., 2005).

1.5.2. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

La estrategia de SFS integra las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación de forma simultánea (Moreno y col., 2013a). En esta configuración, la glucosa que se va liberando se consume al mismo tiempo por el microorganismo fermentador, mitigando los efectos inhibitorios por producto final sobre las enzimas. Sin embargo, en esta configuración, las diferentes condiciones óptimas de temperatura y pH para la sacarificación y la fermentación son unos de los principales inconvenientes. Los microorganismos comúnmente empleados en la fermentación poseen una temperatura óptima de crecimiento de 30-35 °C. Esta temperatura está muy por debajo del óptimo de las enzimas hidrolíticas (Cardona y Sánchez, 2007), obteniéndose menores rendimientos de hidrólisis enzimática (Olsson y col., 2005).

Con el fin de obtener mayores concentraciones de etanol los procesos de SFS se deben realizar a altas cargas de sustrato. En este caso se aumenta la viscosidad del medio, por lo una etapa previa de sacarificación reduce la viscosidad y favorece la homogenización del medio. Este proceso recibe el nombre de presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS) (Moreno y col., 2012a).

Por otro lado, la SFS permite trabajar bajo un sistema en semicontinuo o “fed-batch”, que consiste en ir incrementando de manera gradual la carga de sustrato obteniéndose mayores cantidades de azúcares potencialmente fermentables (Moreno y

col., 2013b; Tomás-Pejó y col., 2009). Esta configuración ha sido utilizada con éxito a partir de diferentes materias primas como el bagazo de maíz, paja de trigo, madera de abeto, sorgo dulce o residuos de la industria del papel (Öhgren y col., 2006; Tomás-Pejó y col., 2008; Malek, 2004; Ballesteros y col., 2004, 2010).

Debido a las diferencias en las temperaturas óptimas de la hidrólisis enzimática y fermentación mencionadas anteriormente, el empleo de levaduras termotolerantes, como *K. marxianus* permitiría una mejor integración de las dos etapas produciendo mayores rendimientos de hidrólisis y por tanto mayores concentraciones de etanol (Nonklang y col., 2008). *K. marxianus* es capaz de fermentar a temperaturas superiores a 40 °C y ha sido utilizada con éxito en la producción de bioetanol a partir de chopo, eucalipto, bagazo de sorgo, paja de trigo, herbáceas (*Panicum virgatum*) o paja de cebada (Ballesteros M. y col., 2004; Ballesteros I. y col., 2006; Faga y col., 2010; García-Aparicio y col., 2011). No obstante, como se mencionó anteriormente, a mayor temperatura mayor es la toxicidad del MPC, debido a una mayor fluidez de la membrana celular (Tomás-Pejó y col., 2009). Por lo tanto, una destoxificación previa con lacasas a la etapa de fermentación podría ser crucial para garantizar la fermentabilidad de los hidrolizados.

1.5.3. Bioproceso consolidado (BPC)

El BPC se encuentra en un nivel de integración superior a las HFS y SFS y supone la integración de todas las etapas que tienen lugar tras el pretratamiento. De esta manera, un único microorganismo sería capaz de producir las enzimas hidrolíticas para realizar la sacarificación, a la vez que fermentaría de forma simultánea los azúcares en un único reactor. En la naturaleza no existe un organismo capaz de realizar todo este proceso de manera eficiente por lo que se requiere del desarrollo de nuevos microorganismos mediante el empleo de ingeniería genética y metabólica. Yanase y col. (2010) consiguieron expresar en pared celular de *S. cerevisiae* el sistema celulolítico de *T. reesei* así como la β -glucosidasa de *Aspergillus aculeatus*. Por otro lado, Wen y col. (2010) consiguieron expresar en la pared celular de *S. cerevisiae* EBY100 el sistema enzimático extracelular o celulosoma de *Clostridium thermocellum*, de esta forma consiguieron aumentar la eficiencia en la producción de etanol al mejorar la sinergia de las tres celulasas implicadas en la hidrólisis de celulosa.

En la actualidad los BPC están todavía lejos de representar una estrategia real. No obstante, diversos microorganismos están siendo modificados mediante ingeniería genética para optimizar un sistema adecuado de expresión enzimática.

1.5.4. Integración de la etapa de biodestoxificación con lacasas

La etapa de destoxificación puede ser crucial para hacer fermentables materiales pretratados que no lo eran debido a su alta concentración de inhibidores. Además, en los procesos de producción de etanol mediante SFS con levaduras termotolerantes, la elevada susceptibilidad de las levaduras a los inhibidores a temperaturas superiores a 40 °C hace muy interesante la realización de una etapa de biodestoxificación previa a la fermentación. En este contexto, la adición externa de lacasas con el fin de reducir los compuestos fenólicos del MPC es una prometedora estrategia para aumentar la fermentabilidad de los medios.

El tratamiento con lacasas se puede integrar, tanto en las configuraciones de HFS como SFS. En ambas estrategias, el tratamiento con lacasa se puede realizar antes de la etapa de hidrólisis o posteriormente a ella. Sin embargo, a diferencia del efecto positivo que ejerce el tratamiento con lacasas sobre los microorganismos fermentativos, el efecto sobre la hidrólisis enzimática ha mostrado resultados contradictorios. Moilanen y col. (2011) utilizaron la lacasa de *C. unicolor* para destoxificar madera de picea y rastrojo de caña común (*Arundo donax*) pretratadas por explosión por vapor. El tratamiento con lacasa mejoró el rendimiento de hidrólisis enzimática cuando se utilizaba madera de picea. Por el contrario, observaron menores rendimientos de hidrólisis cuando el tratamiento con lacasa se utilizó en caña común. Este mismo efecto negativo de la lacasa sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática fue observado por otros autores en MPC de paja de trigo obtenido por explosión por vapor (Moreno y col., 2012, Jurado y col., 2009).

En este sentido, la realización del tratamiento con lacasas antes o después de la hidrólisis enzimática depende en gran medida de la biomasa que se emplee y de la concentración de fenoles presente en el MPC. De esta manera, si se utiliza biomasa pretratada procedente de trigo o herbáceas, al realizar un tratamiento anterior a la hidrólisis enzimática se eliminarían los compuestos fenólicos que son conocidos inhibidores de las celulasas pero implicaría menores recuperaciones de glucosa. En este caso una estrategia de hidrólisis separada de la destoxificación y fermentación (HyDyF) podría ser una estrategia acertada. No obstante, esta estrategia conllevaría un

incremento en el riesgo de contaminación debido al trasvase de material entre diferentes reactores y un aumento en el tiempo del proceso. Por otro lado, la estrategia de realizar la destoxificación simultáneamente a la sacarificación y fermentación en un proceso de SFS (SDFS), reduciría el tiempo del proceso pero, tendrían lugar los efectos negativos del tratamiento con lacasas sobre la hidrólisis enzimática. Una última estrategia que separe parcialmente la hidrólisis enzimática de la etapa de destoxificación y fermentación (hidrólisis y fermentación híbrida (HFH)) representaría una alternativa prometedora.

En este contexto, debido a la falta de estudios que expliquen los mecanismos inhibitorios que ejerce el tratamiento con lacasas en la hidrólisis enzimática del MPC de paja de trigo, el objetivo de esta presente Tesis es elucidar dichos mecanismos, así como optimizar el tratamiento con lacasas para mejorar su integración en procesos de HFH de paja de trigo pretratada por explosión por vapor.

Por último, de la misma forma que la producción de celulasas puede realizarse en un BPC, las lacasas pueden ser expresadas mediante metodologías de integración y modificación genética en los microorganismos fermentadores. En este sentido, Larsson y col. (2001) consiguieron sobreexpresar la lacasa de *T. versicolor* en *S. cerevisiae* INVSCI. Esta cepa fue capaz de fermentar un hidrolizado de picea a mayor velocidad que la cepa no modificada. En la misma línea, Nakanishi y col. (2012) expresaron la lacasa de la cepa de *Trametes* sp. Ha1 en la pared de *S. cerevisiae* BY4741. Esta cepa se empleó para la biodestoxificación *in situ* de paja de arroz pretratada hidrotermalmente, observándose una mejora en la fermentabilidad del material pretratado.

La figura 14 esquematiza los diferentes niveles de integración de las etapas de hidrólisis enzimática, fermentación y biodestoxificación con lacasas durante la producción de etanol lignocelulósico a partir de paja de trigo.

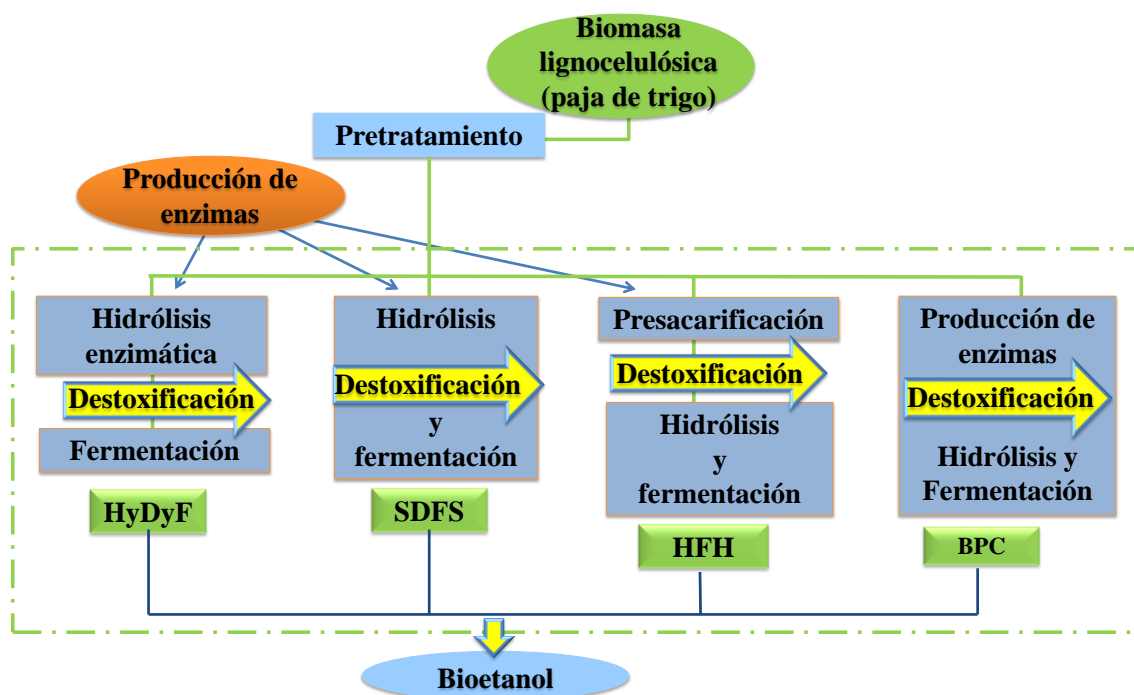


Figura 14. Diferentes niveles de integración de las etapas del proceso de producción de etanol a partir de paja de trigo y las posibles estrategias de integración del tratamiento con lacasa.

2. Objetivos

El tratamiento enzimático del MPC de paja de trigo con lacasas supone una reducción del contenido fenólico lo que se traduce en una mejora de la fermentabilidad obteniéndose unos mayores rendimientos de etanol. Sin embargo, la destoxificación con lacasas ejerce un efecto negativo sobre la hidrólisis enzimática. En este sentido, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es obtener una integración eficaz del tratamiento con enzimas lacasas en el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa. Para la consecución del objetivo principal se han identificado los siguientes objetivos específicos:

- I) Entender los efectos que ejerce el tratamiento con lacasa sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor.
 - a. Esclarecer el papel de los radicales fenoxilo y los polímeros fenólicos formados por la oxidación de la lacasa en la inhibición de las enzimas hidrolíticas.
 - b. Estudiar si la presencia de lignina, así como los cambios originados en su estructura por la acción de la lacasa, ejercen un efecto negativo sobre la hidrólisis enzimática.
- II) Diseñar una estrategia del proceso de producción de etanol incluyendo la etapa de destoxificación con lacasas sin que se vea afectada la hidrólisis enzimática de la celulosa.
 - a. Estudiar el efecto de la dosis de lacasa sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor.
 - b. Evaluar el efecto de la dosis de lacasa, el tiempo de destoxificación y el tamaño de inóculo de levadura sobre la producción de etanol en un proceso de Hidrólisis y Fermentación Híbrida (HFH).

3. Resultados Publicados

Artículo 1

Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw

Alfredo Oliva-Taravilla, Antonio D. Moreno, Marie Demuez, David Ibarra, Elia Tomás-Pejó, Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros

Bioresource Technology (2015) 175, 209–215.

doi:10.1016/j.biortech.2014.10.086

Reproduced with permission from Elsevier.

Abstract

Laccase enzymes are promising detoxifying agents during lignocellulosic bioethanol production from wheat straw. However, they affect the enzymatic hydrolysis of this material by lowering the glucose recovery yields. This work aimed at explaining the negative effects of laccase on enzymatic hydrolysis.

Relative glucose recovery in presence of laccase (10 IU/g substrate) with model cellulosic substrate (Sigmacell) at 10% (w/v) was almost 10% points lower ($P < 0.01$) than in the absence of laccase. This fact could be due to an increase in the competition of cellulose binding sites between the enzymes and a slight inhibition of β -glucosidase activity. However, enzymatic hydrolysis and infrared spectra of laccase-treated and untreated wheat straw filtered pretreated residue (WS-FPR), revealed that a grafting process of phenoxy radicals onto the lignin fiber could be the cause of diminished accessibility of cellulases to cellulose in pretreated wheat straw.

Keywords: Lignocellulose; Enzymatic hydrolysis; Laccase detoxification; Grafting; ATR-FTIR

Nomenclature

ANOVA- analysis of variance

ATR–FTIR- attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy

DW- dry weight

FPU- filter paper unit

IU- international unit

PEG- polyethylene glycol

Raw material- milled wheat straw (particle size: 2–10 mm)

RGR- relative glucose recovery

Sigmacell- model cellulosic substrate Sigmacell Type 50® (Sigma S5504)

Slurry- whole steam-exploded wheat straw

WS-FPR- wheat straw filtered pretreated residue (vacuum-filtered but not washed)

1. Introduction

Concerns about climate change and uncertainties about fuel supply make renewable biofuels, such as bioethanol and biodiesel, attractive options for oil replacement in the short-term perspective. Presently, international governments have adopted some policies, such as the European Union Directive 2009/28/CE (2009), to gradually replace fossil fuels by biomass-based fuels or biofuels. Moreover, innovative technologies and advanced biorefineries based on lignocellulosic biomass are expected to play an important role in future bio-economy in Europe. Lignocellulosic biorefineries are expected to provide different forms of energy such as bioethanol and create new markets for bio-based products such as food, feed, chemicals and materials.

Lignocellulosic biomass is an abundant, low-cost and widely distributed feedstock. Among different lignocellulosic raw materials, wheat straw is an ideal candidate for bioethanol production worldwide (Tomás-Pejó et al., 2008). The biochemical conversion of lignocellulose into ethanol is performed via enzymatic hydrolysis of the carbohydrates to monomeric sugars, which are subsequently converted into ethanol by a fermentation step. The process is, however, hindered by the complex and recalcitrant structure of the lignocellulosic materials and thus, a pretreatment step is needed to increase biomass digestibility. Hydrothermal methods, such as steam explosion, are cost-effective technologies to increase the accessibility of enzymes to cellulose by solubilization of hemicelluloses and lignin redistribution (Alvira et al., 2010). Nevertheless, harsh conditions applied in these pretreatments also promote sugar and lignin degradation, triggering the formation of weak acids, furan derivatives and phenolic compounds which inhibit enzymes and microorganisms performance (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000 and Ximenes et al., 2010). The removal of the inhibitors from the fermentation broth, also known as detoxification, is an interesting alternative to overcome the negative effect of these compounds. As a detoxification method, *in situ* laccase treatment represents an appropriate option since the process is carried out in the same vessel under mild conditions (Parawira and Tekere, 2011 and Moreno et al., 2014). Laccases are multicopper-containing phenoloxidases that catalyze the oxidation of substituted phenols, anilines and aromatic thiols at the expense of molecular oxygen. Laccase addition to pretreated lignocellulosic materials selectively removes the phenolic compounds formed during the hydrothermal pretreatment

(Jönsson et al., 1998, Jurado et al., 2009, Moreno et al., 2012 and Moreno et al., 2013a). This phenol removal by laccases leads to improved fermentation performance of microorganisms, shortening the lag phase and boosting cell viability. In consequence, ethanol volumetric productivities are enhanced and the overall process time is reduced. Nevertheless, in case of steam-exploded wheat straw, laccase-detoxified biomass shows lower glucose hydrolysis yields during the saccharification step, which implies a reduction in the final ethanol concentrations (Jurado et al., 2009, Moreno et al., 2012, Moreno et al., 2013a and Moreno et al., 2013b).

Several hypotheses have been proposed to explain the lower glucose recovery yields after laccase treatment: (1) laccases increase the non-specific adsorption of hydrolytic enzymes onto the lignocellulosic fibers by catalyzing reactions on lignin (Moilanen et al., 2011); (2) laccases cause strengthening of carbohydrate-lignin bonds (Moilanen et al., 2011) and (3) formation of laccase-derived compounds can inhibit the hydrolytic enzymes (Jurado et al., 2009 and Tejirian and Xu, 2011). Although all these inhibition mechanisms seem to be accepted, there is no information about the alternatives to overcome this limitation. The present work attempts to establish a better understanding of the effects observed during the enzymatic hydrolysis of laccase-treated steam-exploded wheat straw for the optimum integration of the detoxification step into the current lignocellulosic bioethanol production process.

In this work, the effect of laccase on enzymatic activities of cellulases was examined to discard any direct effect of laccases on those hydrolytic enzymes. Furthermore, the effect of laccase was studied in enzymatic hydrolysis experiments of model cellulosic substrate (Sigmacell) without lignin polymer using different substrate concentration and laccase loadings, which could give information about a potential physical interaction or hindrance between the enzymes. Concurrently, in order to reduce a possible non-specific adsorption of cellulases on to the lignin fiber, steam-exploded wheat straw was enzymatically hydrolyzed in the presence of laccase adding polyethylene glycol (PEG). The chemical composition of the wheat straw filtered pretreated residue (WS-FPR) was studied after 3 h incubation with laccase without hydrolytic enzymes. Finally, attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectra were determined for laccase treated or untreated WS-FPR after the enzymatic hydrolysis.

2. Methods

2.1. Raw material and pretreatment

Wheat straw was supplied by CEDER-CIEMAT (Soria, Spain). This material presented the following composition (% (w/v) dry weight (DW)): cellulose, 40.5; hemicelluloses, 26.1 (xylan, 22.7; arabinan, 2.1; and galactan, 1.3); Klason lignin, 18.1; ash, 5.1; and extractives, 14.6 (Alvira et al., 2011).

The biomass was milled until a particle size between 2 and 10 mm using a laboratory hammer mill. The milled wheat straw was pretreated by steam explosion in a 2 L reactor without acid impregnation, considering a severity factor of 3.94 (200 °C for 10 min). The whole steam-exploded wheat straw was vacuum filtered and the wheat straw filtered pretreated residue (WS-FPR) was used as substrate. Since the WS-FPR was unwashed, low amount of phenolic compounds remained soaked in the material. The chemical composition of the WS-FPR was characterized as described in the Section 2.6. having the following composition (% DW (w/v)): hemicellulose, 8.4; cellulose, 55.0 and Klason lignin 33.6. The material was kept at 4 °C until use.

The model cellulosic substrate used was Sigmacell Type 50® (Sigma S5504). This substrate is considered as high purity cellulose according to manufacture information.

2.2. Enzymes

Pycnoporus cinnabarinus laccase (60 IU/mL; 8 g/L), produced by Beldem (Belgium), was used for the evaluation of laccase treatment. Laccase activity was measured by the oxidation of 5 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) to its cation radical ($\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 0.1 M sodium acetate (pH 5) at 24 °C.

A mixture of the preparations NS50013 (60 FPU/mL cellulase activity; 150 g/L total protein content) and NS50010 (510 IU/mL β -glucosidase activity; 200 g/L total protein content), both produced by Novozymes (Denmark), was used for the enzymatic hydrolysis.

Total protein content from all enzymatic preparations was analyzed by BCA protein assay kit (Pierce Ref. 23225), using bovine serum albumin as standard.

2.3. Enzymatic activities of hydrolytic enzymes

Overall cellulase activity of NS50013 was determined using filter paper (Whatman No. 1 filter paper strips), while β -glucosidase activity of NS50010 was measured using cellobiose as substrate (Ghose, 1987). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that transforms 1 μ mol of substrate per minute.

Activities of those hydrolytic enzymes in presence of 0.5, 1 and 2 IU/mL of *P. cinnabarinus* laccase were measured in order to detect any direct effect of laccase on hydrolytic enzymes.

2.4. Enzymatic hydrolysis of Sigmacell and wheat straw filtered pretreated residue (WS-FPR)

The model cellulosic substrate Sigmacell and the lignocellulosic substrate (WS-FPR) were hydrolyzed to evaluate the effect of laccase supplementation.

Sigmacell was diluted to 5% or 10% DW (w/v) with citrate buffer 50 mM, pH 5, and subjected to saccharification with optimal dosage of hydrolytic enzymes for a complete enzymatic hydrolysis: 15 FPU/g DW substrate of NS50013 and 15 IU/g DW substrate of NS50010 (Tomás-Pejó et al., 2009). The enzymatic hydrolysis of 5% DW (w/v) Sigmacell was performed in presence of 10 IU laccase/g DW substrate. In case of 10% DW (w/v) Sigmacell, laccase was supplemented at 1, 5, 10 and 15 IU laccase/g DW substrate. Hydrolysis of Sigmacell at 5% and 10% DW (w/v) without laccase were used as control.

In a second set of experiments, WS-FPR was diluted to 10% DW (w/v) with citrate buffer 50 mM, pH 5. In order to enable a better detection of any difference on enzymatic hydrolysis yields, low enzyme dosages were used. More specifically, enzyme dosage was 5 FPU NS50013/g DW of substrate and 5 IU NS50010/g of DW substrate. PEG was added at different concentrations: 0.5%, 1%, 2.5% and 5% DW (w/w) of substrate with or without laccase (10 IU /g DW of substrate). WS-FPR with hydrolytic enzymes and without PEG or laccase was used as control. Hydrolytic enzymes, PEG and laccase were added simultaneously when applied.

After the hydrolysis step, laccase and non-laccase supplemented WS-FPR without PEG were centrifuged at 5000 rpm for 10 min to collect the solid fraction. Solids were dried in an oven at 40 °C during 3 days and analyzed by ATR-FTIR.

All assays were run in triplicate in 100 mL-flasks at 50 °C and 150 rpm for 72 h. Representative samples were withdrawn periodically, centrifuged and supernatants were analyzed for glucose concentration. For better comparison between assays, relative glucose recovery (RGR) was calculated as follow:

$$\text{RGR (\%)} = \frac{\text{g/L glucose assay} \times 100}{\text{g/L glucose control}}$$

2.5. Effect of laccase treatment on WS-FPR without hydrolytic enzymes

To evaluate the changes in the chemical composition of the WS-FPR after 3 h of laccase treatment, 10% DW (w/v) WS-FPR was supplemented with 10 IU/g DW of substrate of *P. cinnabarinus* laccase without hydrolytic enzymes. This assay was run in triplicate in 100 mL-flasks at 50 °C and 150 rpm for 3 h in a rotary shaker. Laccase-treated and non-treated WS-FPR were filtered and washed and the chemical composition of the solid residues was analyzed as explained in Section 2.6.

2.6. Analytical methods

The chemical composition of non-treated and laccase-treated (3 h) WS-FPR was analyzed using the National Renewable Energy Laboratory (NREL) standard methods for determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP-002, LAP-003, and LAP-019) (Sluiter et al., 2010). Dry weight of WS-FPR was determined by drying a representative sample at 105 °C for 24 h (LAP-001). Total phenolic content of the supernatants was determined according to a modified version of the Folin–Ciocalteu method (Alvira et al., 2013).

Glucose concentration was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a refractive index detector. An Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA), operated at 50 °C with 5 mM H₂SO₄ as a mobile-phase (0.4 mL/min), was employed for separation.

The dried solid residues obtained after the enzymatic hydrolysis of laccase-treated or non-treated WS-FPR without PEG were analyzed by ATR–FTIR in order to determine chemical changes in the fibers. Sample preparation was carried out with KBr. 5% (w/w) of dried biomass was analyzed in a FTIR spectrometer (Thermo Scientific Nicolet 6700 spectrometer) using an attenuated total reflectance (ATR) accessory and

deuterated triglycine sulfate detector. Spectra were collected at room temperature in the 4000–400 cm^{-1} range with a 1.928 cm^{-1} resolution and being an average of 64 scans.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics v22.0 for MacOs X Software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The mean and standard deviation were calculated for descriptive statistics. When appropriate, analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was used for comparisons between assays. The level of significance was set at $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$. In addition, the effects of laccase dosage during the enzymatic hydrolysis of Sigmacell at 10% DW (w/v) were evaluated by regression analysis.

3. Results and discussion

3.1. Effect of laccase on cellulose and β -glucosidase activities

The effect of laccase on cellulolytic enzymes was evaluated in absence of soluble phenolic compounds, lignin and cellulose. Cellulase and β -glucosidase activities were measured in the presence of 0.5, 1 and 2 IU/mL of *P. cinnabarinus* laccase, using filter paper and cellobiose as substrates, respectively, to evaluate the direct interaction between hydrolytic and laccase enzymes (Table 1). In the case of overall cellulase activity (NS50013), ANOVA analysis showed no significant differences at any of the laccase loadings tested. By contrast, β -glucosidase activity (NS50010) showed a significant slight decrease of about 7% points ($P < 0.001$) in the presence of 2 IU/mL of laccase. These results suggest that, among the enzymatic activities present in a cellulolytic cocktail, laccase has more marked effect on the activity of β -glucosidase enzymes.

3.2. Effect of laccase supplementation on enzymatic hydrolysis of model cellulosic substrate (Sigmacell)

Two different consistencies (5% and 10% DW (w/v)) of model cellulosic substrate Sigmacell were subjected to enzymatic hydrolysis in the presence of laccase (Table 2 and Fig. 1). It is worth to mention that laccase and cellulase preparations were added considering the DW of Sigmacell, so that at 10% (w/v) substrate, the total protein concentration was the double than at 5% (w/v). The addition of 10 IU/g substrate (0.5 IU/mL) of laccase during the enzymatic hydrolysis of Sigmacell at 5% DW (w/v) did

not show any significant difference in terms of final RGR. When the substrate concentration increased from 5% to 10% DW (w/v), the addition of 10 IU/g (1 IU/mL) of laccase decreased significantly the final RGR by almost 10% points ($P < 0.01$) compared to those assays performed without laccase. As there were no potential laccase targets due to the absence of lignin and phenols in the medium, this result might be explained by an increase in the competition of cellulose adsorption sites between cellulases and laccases.

Table 1. Cellulase (NS50013) and β -glucosidase (NS50010) activities in the presence of different concentrations of *P. cinnabarinus* laccase.

Laccase ^a (IU/mL)	Relative activity of NS50013 (% FPU)	Relative activity of NS50010 ^b (% IU)
0.0	100.0 \pm 0.8	100.0 \pm 0.1
0.5	99.9 \pm 0.4	99.9 \pm 0.0
1.0	98.3 \pm 3.0	95.4 \pm 0.1***
2.0	99.5 \pm 1.5	92.9 \pm 0.1***

Relative cellulase and β -glucosidase activities were calculated as the percentage of the activity obtained in the presence of laccase divided by the activity in the absence of laccase. Mean values and standard deviations were calculated from the triplicates to present the results.

^aLaccase activities in terms of total volume assay.

^bAnalysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was performed to identify differences between non-supplemented and laccase-supplemented assays. The mean different is significant at the (***) 0.001 level.

Sigmacell at 10% DW (w/v) was enzymatically hydrolyzed with increasing laccase loadings to evaluate if higher laccase dosages promote its reversible adsorption to cellulose, lowering the adsorption sites of hydrolytic enzymes towards this polymer. As listed in Table 2, although the total protein concentration did not change markedly after laccase addition, an increase from 0.14% to 2.06% in the ratio between laccase and hydrolytic enzymes (L/H values) was enough to reduce the RGR about 5% points. Linear and quadratic effects were found when evaluating the decrease of RGR at different laccase dosage (Fig. 2). Although both equations were statistically significant ($P_{\text{linear}} < 0.01$; $P_{\text{quadratic}} < 0.05$), a better trend fit was obtained with the quadratic model ($R^2 = 0.999$). Supporting these results, Qiu and Chen (2012) described an increase in the hydrolysis yields of steam-exploded wheat straw when laccase was added at 0.55 IU/g substrate, however, further increase of laccase dosage decreased the cellulose conversion rate.

Table 2. Laccase loading, total protein concentration, laccase/hydrolytic enzymes ratio and relative glucose recovery (RGR) after 72 h of enzymatic hydrolysis of Sigmacell.

Sigmacell (% (w/v))	Laccase ^a (IU/g)	Protein _{Total} (g/L)	L/H ^b (%)	RGR ^c (%)
5	–	4.80	–	100.0 ± 2.0
	10 (0.5)	4.86	1.37	101.1 ± 0.8
10	–	9.59	–	100.0 ± 1.7
	1 (0.1)	9.60	0.14	95.7 ± 1.3
	5 (0.5)	9.66	0.69	93.9 ± 1.9**
	10 (1.0)	9.72	1.37	92.4 ± 0.7**
	15 (1.5)	9.79	2.06	91.4 ± 0.6**

^aLaccase activities in terms of total volume assay (IU/mL) are indicated in parentheses.

^bPercentage considering the ratio between Laccase (L) and Celluclast + Novo 188 (H).

^cRGR values were calculated as the percentage of the glucose concentration in laccase-supplemented assays divided by the glucose concentration in non-supplemented assays. Mean values and standard deviations were calculated from the triplicates to present the results. Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was performed to identify differences between non-supplemented and laccase-supplemented assays. The mean different is significant at the (**) 0.01 level.

The time course for enzymatic hydrolysis of Sigmacell at 5% and 10% DW (w/v) in presence or absence of 10 IU/g substrate of laccase is shown in Fig. 1. As it was showed previously, at 5% DW (w/v) Sigmacell, the addition of laccase did not show any difference in terms of hydrolysis rates and about 40 g/L of glucose were released in both cases. By contrast at 10% DW (w/v), the addition of laccase decreased the final glucose concentration from 59.7 g/L to 55.2 g/L. Moreover, a significant marked decrease in the hydrolysis rate ($P < 0.01$) was observed after 24 h. As it is well known, endo- and exo-glucanase enzymes are acting on cellulosic polymer at the first stage of the hydrolysis and β -glucosidase is acting sequentially after. Thus, the decrease in hydrolysis rate after 24 h could be explained by the slight inhibition on β -glucosidase activity observed previously in the presence of laccase (Table 1).

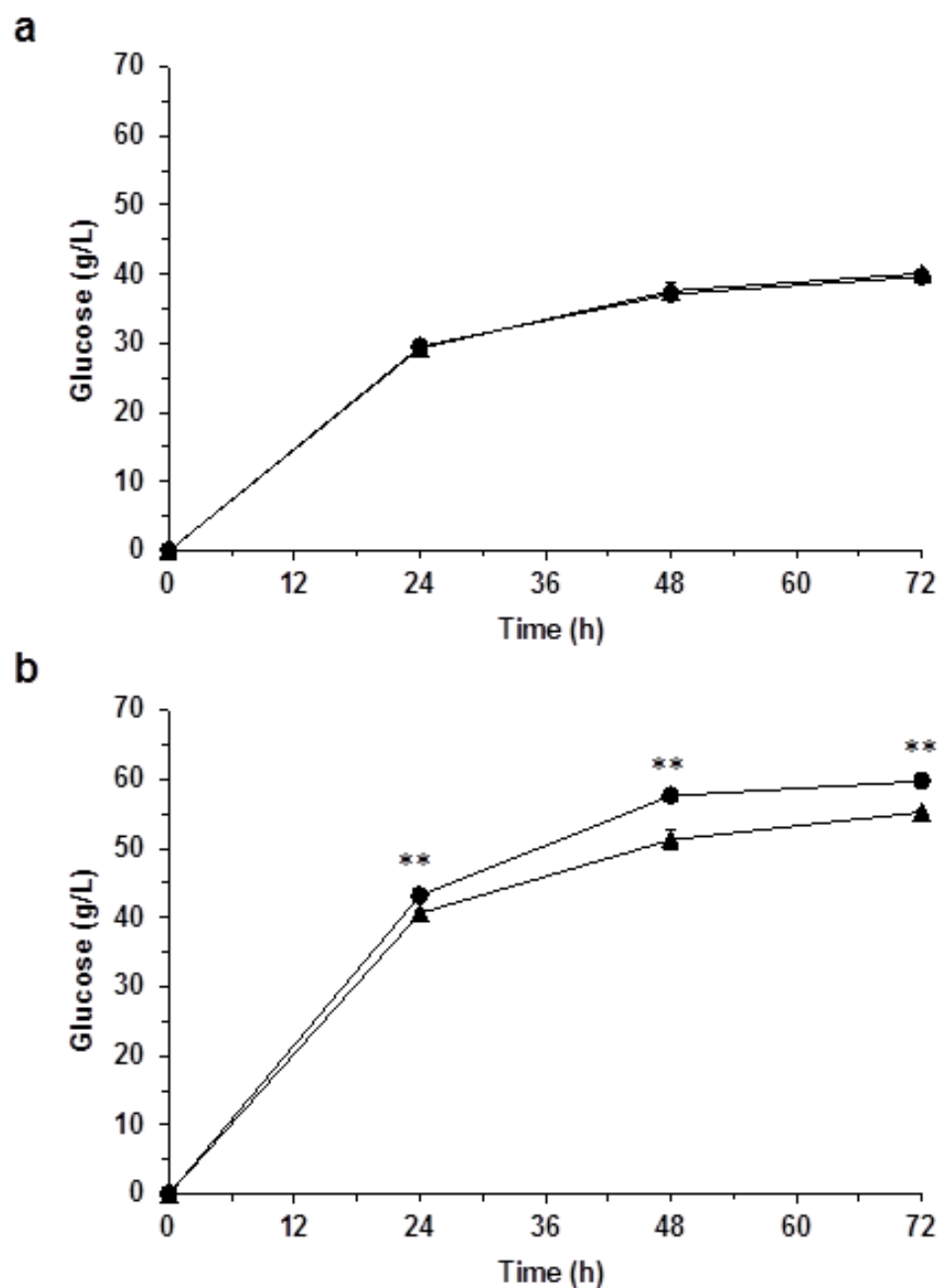


Fig. 1. Time course for glucose release during enzymatic hydrolysis of Sigmacell at 5% DW (w/v) (a) and 10% DW (w/v) (b) in the presence (▲) or absence (●) of *P. cinnabarinus* laccase. Mean values and standard deviations were calculated from triplicates to present the results. A two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was performed to identify differences between non-supplemented and laccase-supplemented assays at different time points. The mean difference is significant at the (**) 0.01 level.

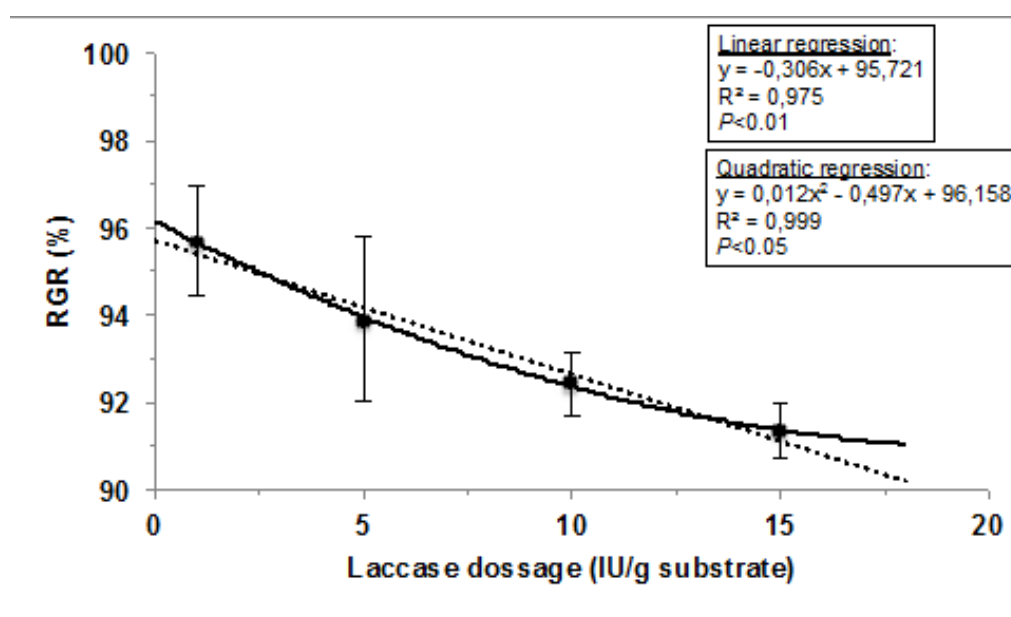


Fig. 2. Influence of laccase dosage on relative glucose recovery (RGR) after the enzymatic hydrolysis of 10% DW (w/v) Sigmacell. Linear (·····) and quadratic (—) trends were calculated by regression analysis.

3.3. Effect of PEG supplementation on enzymatic hydrolysis of WS-FPR in presence of laccase

Since it has been already shown that the addition of non-ionic surfactants such as Berol or Tween 80 and polymers such as polyethylene glycol (PEG) reduces the non-specific adsorption of cellulases (Kristensen et al., 2007), 10% (w/v) of WS-FPR substrate was enzymatically hydrolyzed in the presence or absence of PEG and laccase. PEG concentrations were 0.5%, 1%, 2.5% and 5% (w/w) of substrate. As expected, when WS-FPR was supplemented with 5% (w/w) PEG without laccases, the RGR increased 1.4-fold ($P < 0.001$) compared to control assays without PEG (Fig. 3a). PEG has previously demonstrated to be efficient for enhancing the enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw by decreasing the non-specific adsorption of cellulases (Kristensen et al., 2007 and Cannella and Jørgensen, 2014). However, regardless the PEG concentrations, RGRs were significantly ($P < 0.05$) lower than the control in the presence of laccase (Fig. 3b). These results suggest that the increase in the non-specific adsorption of hydrolytic enzymes in the presence of laccases is not the reason for the reduction in final RGR when using WS-FPR. As it was explained before in the case of Sigmacell, when no lignin neither phenols were in the media, an increase in the competition of cellulose adsorption sites was supposed to be the main reason for

reducing the RGR. However, this effect seemed to be negligible when lignin and phenols are in the media.

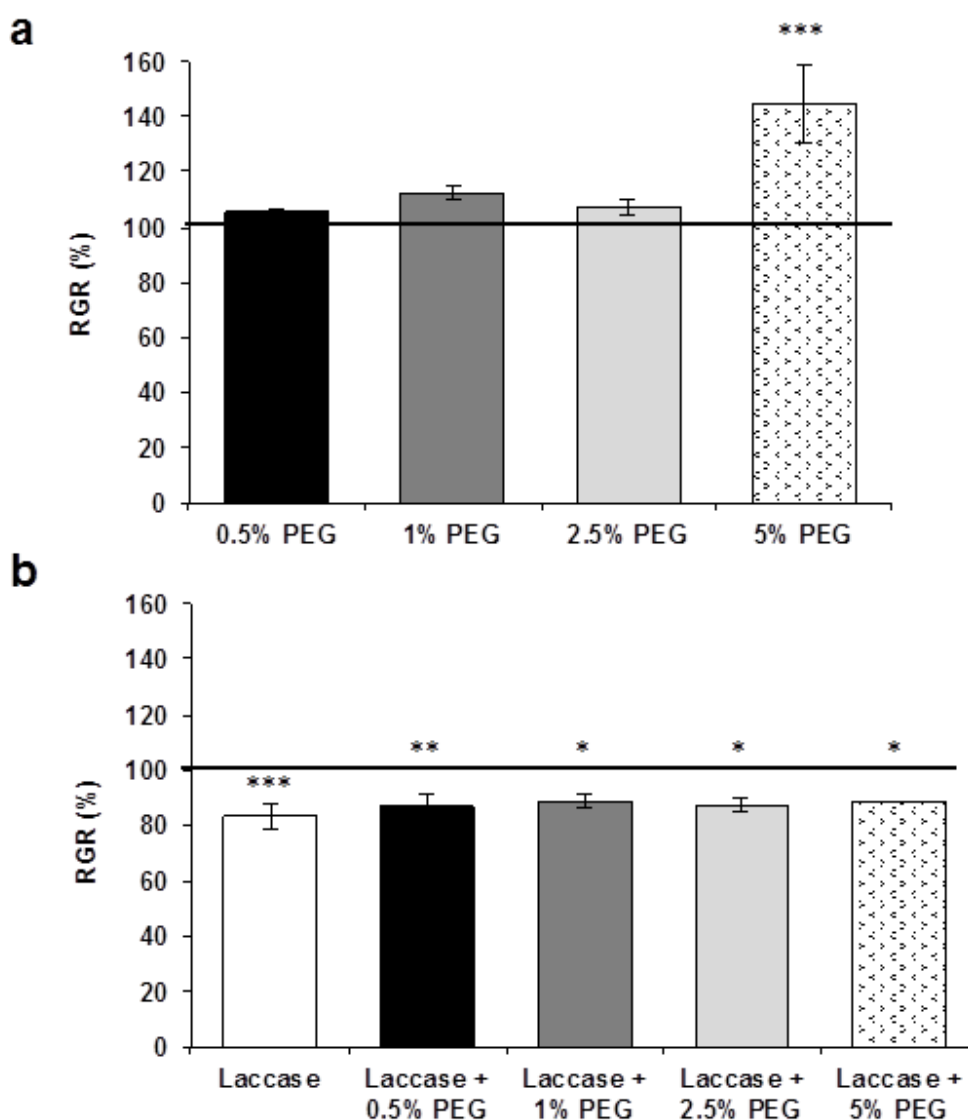


Fig. 3. Relative glucose recovery (RGR) in enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) WS-FPR supplemented with (a) PEG (0.5–5% w/v) and (b) PEG (0.5–5% w/w) + laccase (10 UI/g DW of substrate). Black lines represent RGR values (100%) in control assays (a) without PEG or (b) without PEG and laccase. Mean values and standard deviations were calculated from triplicates to present the results. Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was performed to identify differences between (a) non-supplemented and PEG-supplemented assays or (b) non-supplemented and laccase-supplemented (with or without PEG) assays. The mean difference is significant at the (*) 0.05, (**) 0.01 or (***) 0.001 level.

After 24 h of enzymatic hydrolysis, total phenol concentration was measured to verify the laccase detoxification ability in presence of 5% (w/w) of PEG. The total phenolic concentration decreased about 80% points ($P < 0.001$) after laccase treatment, regardless the presence or absence of PEG (no significant differences were found in

terms of total phenolic content between assays supplemented with laccase or laccase + PEG) (Fig. 4). Therefore, PEG does not affect laccase activity in terms of phenol removal.

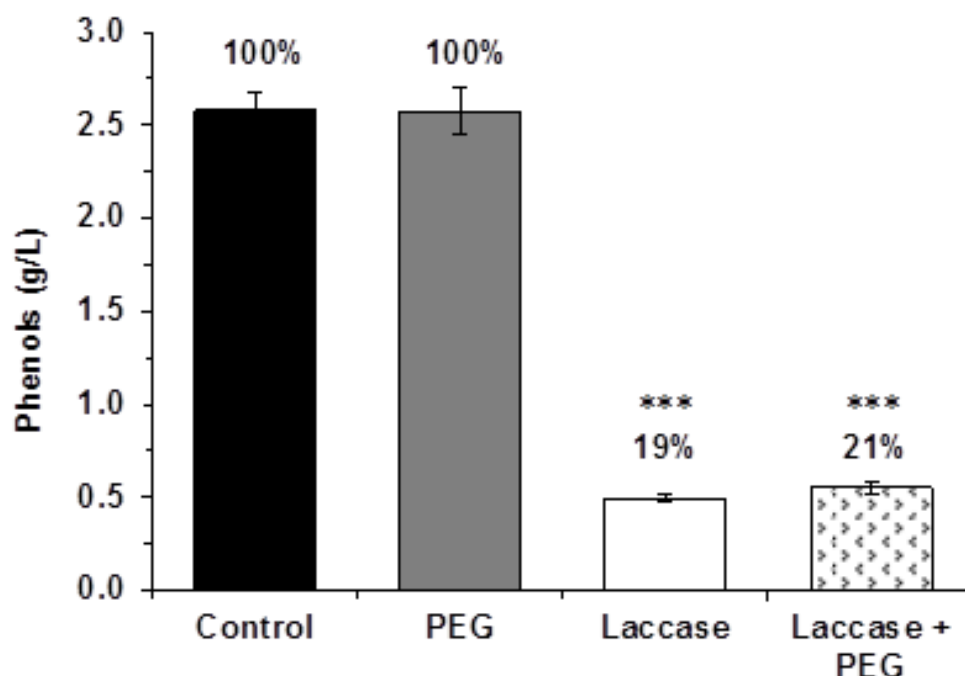


Fig. 4. Total soluble phenols measured at 24 h of enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) WS-FPR. Assays were supplemented with 5% (w/w) PEG and/or 10 UI/g DW of *P. cinnabarinus* laccase. Mean values and standard deviations were calculated from triplicates to present the results. Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was performed to identify differences between assays. The mean difference is significant at the (***) 0.001 level.

As ligninolytic enzymes, in addition to soluble phenols removal, laccases have the ability to interact with phenolic units present in lignin polymer. In this context, laccase can alter the hydrophobicity of lignin by increasing or decreasing the non-specific adsorption of hydrolytic enzymes onto this polymer (Palonen and Viikari, 2004 and Moilanen et al., 2011). The high variability of lignin composition among different lignocellulosic materials could explain the contradictory effects regarding laccase interaction with lignin phenolic units. Palonen and Viikari (2004) showed that laccase treatment of steam-exploded spruce increased carboxyl groups of lignin, reducing the hydrophobicity and increasing surface charge. Subsequently, the non-specific adsorption of cellulases to lignin decreased and the glucose hydrolysis yields were improved. Moilanen et al. (2011) obtained similar results when using steam-exploded spruce treated with laccase. Nevertheless, these authors also reported an increase in the

non-specific adsorption of hydrolytic enzymes and lower glucose yields, when laccase treatment was performed on steam-exploded giant reed (*Arundo donax*).

3.4. Characterization of WS-FPR before and after the enzymatic hydrolysis in presence or absence of laccase

Although the increment in the non-specific bindings of hydrolytic enzymes to the lignocellulosic fibers did not seem to be the main reason for the lower RGR registered after laccase treatment, there are other factors that could explain this outcome. Since the reaction mechanism of laccase involves an oxidative polymerization process via formation of unstable radicals, the formed phenolic polymers could exert a greater inhibitory effect on hydrolytic enzymes. As a matter of fact, Tejirian and Xu (2011) observed that oligomeric phenols formed after the pretreatment of lignocellulosic materials could inhibit with a greater extent the enzymatic hydrolysis than single soluble phenols.

On the other hand, radicals formed by laccase action can also interact with WS-FPR fibers via grafting (Aracri et al., 2010 and Barneto et al., 2012). This reaction mechanism of laccases might incorporate some of the phenols that were solubilized during the steam explosion pretreatment into the pretreated fibers, limiting the enzymatic hydrolysis.

Considering the previous effects, the chemical composition of WS-FPR treated 3 h with laccase was analyzed in the absence of hydrolytic enzymes. Interestingly, in accordance to Aracri et al. (2011), an increase of Klason lignin of 2–3% points was observed. This increase in the lignin content suggests a reintegration of some soluble phenols to the fibers. It has been described that the reaction mechanism of soluble phenols after laccase treatment (oxidative polymerization or grafting) is determined by the nature of the phenolic compound itself. Among different phenols, *p*-hydroxycinnamic acids, such as *p*-coumaric acid or ferulic acid, can be covalently coupled to the lignin component of the fibers after laccase treatment, while others such as syringaldehyde lead to the oxidative polymerization (Aracri et al., 2010 and Barneto et al., 2012). As an herbaceous crop, wheat straw contains considerable amount of *p*-coumaric acid (5% DW w/w) and ferulic acid (5% DW w/w) on its composition that can be released during the pretreatment (Buranov and Mazza, 2008 and Moreno et al., 2012). In this sense, laccase would incorporate these compounds onto the fiber,

justifying the slight increase in Klason lignin content and, therefore, limiting the accessibility of cellulose.

For a better understanding of the grafting process, solid residues that remained after the enzymatic hydrolysis of WS-FPR in the presence or absence of laccase were analyzed by ATR-FTIR. The absorbance in the mid-infrared region ($2000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) corresponds to lignin and carbohydrate bonds (Sun et al., 2005b). Both spectra were clearly dominated by carbohydrate bands, including a band at 900 cm^{-1} characteristic of β -glycosidic linkages; a region at $1160\text{--}1035\text{ cm}^{-1}$ dominated by ring vibrations overlapped with stretching vibration of (C–OH) side groups; and a band at 1375 cm^{-1} due to symmetric bending of aliphatic C–H. Lignin bands were also observed, including the characteristic triplet at 1600, 1512 and the 1429 cm^{-1} band ascribed to aromatic ring vibrations, together with the bands at 1657 cm^{-1} (stretching of C=O conjugated to aromatic rings) and at $1726\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ (stretching of C=O unconjugated to aromatic rings) (Sun et al., 2005b and Ibarra et al., 2004). In general, no significant differences were found between both spectra, except the increase and reduction of intensities observed at 1160 and 1512 cm^{-1} , respectively. The 1160 cm^{-1} band, previously assigned to carbohydrates, is also attributed to antisymmetric C–O stretching vibration, indicating the ester-linked hydroxycinnamic acids such as esterified *p*-coumaric acid and ferulic acid (Sun et al., 2002). On the other hand, variations at 1512 cm^{-1} are indicative of changes in surface lignin and its lower intensity proves the action of laccase towards phenolic lignin units present in the surface of the fibers (Mattinen et al., 2005 and Kahar, 2013). This outcome, together with the increase in Klason lignin reported above, supports the grafting hypothesis where *p*-hydroxycinnamic acids are incorporated into the WS-FPR fibers. This hypothesis was also recently supported by Rencoret et al. (2014) that showed the grafting process of ferulic acid on high lignin sisal pulp after laccase treatment.

In addition to the differences observed at 1512 and 1160 cm^{-1} , the ATR-FTIR spectrum of laccase-treated WS-FPR exhibited higher intensities values in the carbohydrate region ($1035\text{--}1109\text{ cm}^{-1}$). In agreement with this result, Moilanen et al. (2011) also reported higher residual glucan content after the enzymatic hydrolysis of laccase-treated giant reed (*A. donax*). Assuming that the grafting process is taking place, the new-formed bonds might affect the accessibility of enzymes to cellulose, probably by reducing the number and/or the size of pores or hindering the progress of cellulases. The grafting process could also result in an increment of the lignin surface area by

incorporating new lignin units therefore limiting the accessibility of cellulolytic enzymes to cellulose.

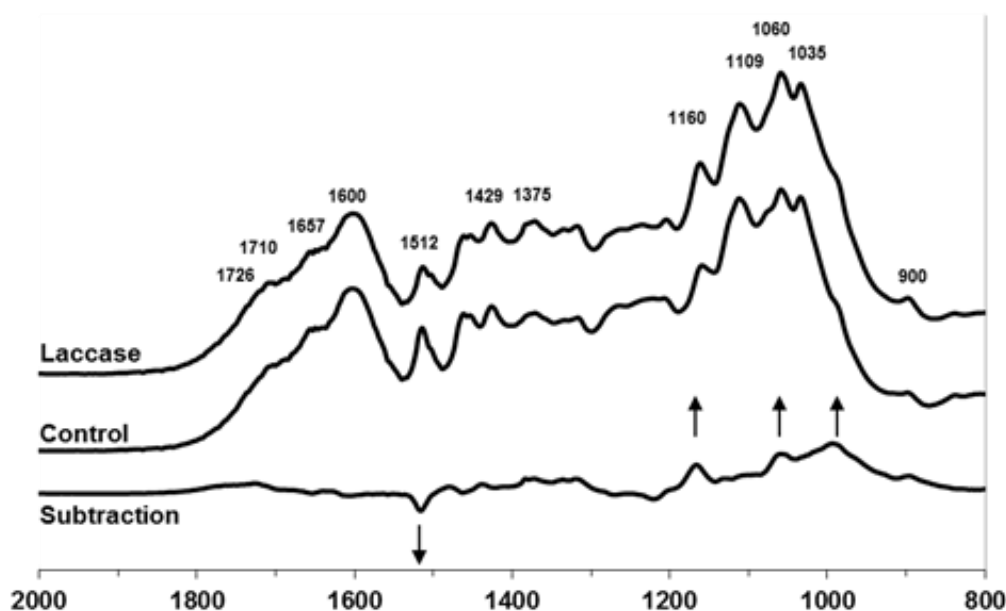
4. Conclusions

An increase in the competition of cellulose binding sites between cellulases and laccase together with the inhibition on β -glucosidase activity seemed to be the main reasons for RGR reduction on model cellulosic substrate enzymatic hydrolysis. According to experiments with PEG addition, non-specific adsorption of cellulases was negligible on WS-FPR. It could be thus suggested that the presence of phenols and lignin promoted different effects. The increase in Klason lignin together with the changes observed in the ATR–FTIR spectra for laccase-treated or non-treated WS-FPR supported the grafting process that would limit the accessibility of cellulolytic enzymes to cellulose.

Acknowledgements

Dr. Ignacio Ballesteros (CIEMAT) is greatly acknowledged for helping in the pretreatment and characterization of wheat straw. The authors wish to thank the Spanish MIMECO for funding this study via Project CTQ2013-47158-R.

Appendix. Supporting Information



SD 1. Infrared absorption spectra (cm^{-1}) of the solid residue obtained after the enzymatic hydrolysis. Assays were supplemented (Laccase) or not (Control) with *P. cinnabarinus* laccase. Differences (Subtraction) were obtained by subtraction of control spectrum on laccase-supplemented spectrum.

References

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861.
- Alvira, P., Negro, M.J., Ballesteros, M., 2011. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 4552–4558.
- Alvira, P., Moreno, A.D., Ibarra, D., Sáez, F., Ballesteros, M., 2013. Improving the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by laccases during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high substrate loadings. *Biotechnol. Progr.* 29, 74–82.
- Aracri, E., Fillat, A., Colom, J.F., Gutiérrez, A., Del Río, J.C., Martínez, A.T., Vidal, T., 2010. Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases. *Bioresour. Technol.* 101, 8211–8216.
- Aracri, E., Roncero, M.B., Vidal, T., 2011. Studying the effects of laccase-catalysed grafting of ferulic acid on sisal pulp fibers. *Bioresour. Technol.* 102, 7555–7560.

- Barneto, A.G., Aracri, E., Andreu, G., Vidal, T., 2012. Investigating the structure-effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps. *Bioresour. Technol.* 112, 327–335.
- Buranov, A.U., Mazza, G., 2008. Lignins in straw of herbaceous crops (Review). *Ind. Crops Prod.* 28, 237–259.
- Cannella, D., Jørgensen, H., 2014. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? *Biotechnol. Bioeng.* 111, 59–68.
- Directive 2009/28/EC, Brussels (2009) available from: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:140:0016:0062:en:PDF>.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Ibarra, D., Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M., Romero, J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2004. Isolation of high-purity residual lignins from eucalypt paper pulps by cellulase and proteinase treatments followed by solvent extraction. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 173–181.
- Jönsson, J.L., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.O., Hahn-Hägerdal, B., 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 691–697.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100, 6378–6384.
- Kahar, P., 2013. Synergistic effects of pretreatment process on enzymatic digestion of rice straw for efficient ethanol fermentation. In: Petre, M. (Ed.), *Environmental biotechnology – new approaches and prospective applications*. InTech, Rijeka, pp. 65–87.
- Kristensen, J.B., Borjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jørgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 888–895.
- Mattinen, M.L., Kruus, K., Buchert, J., Nielsen, J.H., Andersen, H.J., Steffensen, C.L., 2005. Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. *FEBS J.* 272, 3640–3650.
- Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., Viikari, L., 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 492–498.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Fernández, J.L., Ballesteros, M., 2012. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresour. Technol.* 106, 101–109.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M., 2013a. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresour. Technol.* 135, 239–245.

- Moreno, A.D., Tomás-Pejó, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., Olsson, L., 2013b. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. *Bioresour. Technol.* 143, 337–343.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., 2014. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. *Crit. Rev. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.878896>, In press.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* 74, 17–24.
- Palonen, H., Viikari, L., 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 550–557.
- Parawira, W., Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 20–31.
- Qiu, W., Chen, H., 2012. Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. *Bioresour. Technol.* 118, 8–12.
- Rencoret, J., Aracri, E., Gutiérrez, A., Del Río, J.C., Torres, A.L., Vidal, T., Martínez, A.T., 2014. Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers. *Biochem. Eng. J.* 86, 16–23.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W., 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks 1. Review and description of methods. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9043–9053.
- Sun, R.C., Sun, X.F., Wang, S.Q., Zhu, W., Wang, X.Y., 2002. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast growing poplar wood. *Ind. Crop. Prod.* 15, 179–188.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr. Res.* 340, 97–106.
- Tejirian, A., Xu, F., 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 239–247.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 874–884.
- Tomás-Pejó, E., García-Aparicio, M., Negro, M.J., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2009. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresour. Technol.* 100, 890–895.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 170–176.

Artículo 2

Inhibition of Cellulose Enzymatic Hydrolysis by Laccase-Derived Compounds from Phenols

Alfredo Oliva-Taravilla, Elia Tomás-Pejó, Marie Demuez, Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros

Bioresource Technology (2015) 175, 209–215.

doi: 10.1002/btpr.2068.

Reproduced with permission from Wiley online Library.

Abstract

The presence of inhibitors compounds after pretreatment of lignocellulosic materials affects the saccharification and fermentation steps in bioethanol production processes. Even though, external addition of laccases selectively removes the phenolic compounds from lignocellulosic prehydrolysates, when it is coupled to saccharification step, lower hydrolysis yields are attained. Vanillin, syringaldehyde and ferulic acid are phenolic compounds commonly found in wheat-straw prehydrolysate after steam-explosion pretreatment. These three phenolic compounds were used in this study to elucidate the inhibitory mechanisms of laccase-derived compounds after laccase treatment. Reaction products derived from laccase oxidation of vanillin and syringaldehyde showed to be the strongest inhibitors. The presence of these products causes a decrement on enzymatic hydrolysis yield of a model cellulosic substrate (Sigmacell) of 46.6 and 32.6%, respectively at 24 h. Moreover, a decrease in more than 50% of cellulase and β -glucosidase activities was observed in presence of laccase and vanillin. This effect was attributed to coupling reactions between phenoxyl radicals and enzymes. On the other hand, when the hydrolysis of Sigmacell was performed in presence of prehydrolysate from steam-exploded wheat straw a significant inhibition on enzymatic hydrolysis was observed independently of laccase treatment. This result pointed out that the other components of wheat-straw prehydrolysate are affecting the enzymatic hydrolysis to a higher extent than the possible laccase-derived products.

Keywords: laccase, phenols, cellulolytic enzymes, phenoxyl radicals, enzymatic hydrolysis

1. Introduction

Concerns about depletion of oil reserves and negative environmental impacts as a consequence of fossil fuel use, have boosted the research on more sustainable fuels. The substitution of traditional fuels by renewable ones, such as bioethanol and biodiesel, is a promising and attractive option for oil replacement in transportation sector.

Lignocellulosic biomass consists mainly of cellulose, hemicellulose, and lignin. This material is a suitable candidate for bioethanol production because of its wide distribution, low cost, and noncompetition with food crops. Lignocellulosic bioethanol may be produced via enzymatic hydrolysis in which monomeric sugars are released from carbohydrates and are subsequently converted to ethanol through a fermentative process. The recalcitrant structure of lignocellulosic biomass is, however, hampering this bioconversion process. A biomass-disrupting pretreatment is needed to increase the efficiency of the enzymatic hydrolysis (Alvira et al., 2010). Most of the pretreatments are performed under severe conditions resulting in the formation of different by-products, including furans derivatives, weak acids, and phenolic compounds. These byproducts have been reported to inhibit enzymes activity and affect the viability and fermentative capacity of the microorganisms (Oliva et al., 2006).

Among all the potential inhibitors, phenolic compounds have shown to be the most important causes for decreasing cellulases activity and viability of fermentative microorganisms (Ximenes et al., 2010; Kim et al., 2011; Moreno et al., 2013a). The removal of phenolic compounds could be an interesting option to enhance enzyme activity and thereby increasing glucose and ethanol yields in a bioethanol production process. In this context, the application of oxidoreductive enzymes, such as laccases, is appearing as an ecofriendly alternative to remove phenolic compounds from the broth before hydrolysis and fermentation stages.

Laccases are multi copper-containing oxidases with phenoloxidase activity. These enzymes catalyze a one-electron oxidation of substituted phenols (anilines and aromatic thiols) at the expense of molecular oxygen (Thurson, 1996). Laccase oxidation produces reactive phenoxyl radicals that can undergo oxidative polymerization resulting in the formation of less soluble and high-molecular mass oligomeric compounds (Ghoul and Chebil, 2012; Kudanga et al., 2011, 2014). Decreasing phenolic content from

lignocellulosic slurries by laccase treatment allowed reducing the lag phase of the fermentative microorganisms in bioethanol production processes (Moreno et al., 2012; 2013b). In this manner, the volumetric ethanol productivity was enhanced and the overall process time was reduced. It has also been described that laccase treatment improved the hydrolysis yields in softwood (Moilanen et al., 2011) enhancing the ethanol titers. However, when laccases are used for detoxifying biomass from agricultural crops, reduced glucose recovery yields are attained during the saccharification step, which results in low ethanol concentrations (Moreno et al., 2013a; 2012, Jurado et al., 2009). Although some hypotheses can be found in literature (Moilanen et al., 2011; Tejirian and Xu, 2011), the inhibitory mechanisms of oxidative polymerization of phenols on enzymatic hydrolysis of cellulose remain unclear.

The objective of the current study was to investigate whether the formation of laccase-derived products, such as phenoxyl radicals or polymeric phenols, inhibited the hydrolytic enzymes. Vanillin (V), syringaldehyde (SA), and ferulic acid (FA) are commonly found in wheat-straw prehydrolysates after steam-explosion pretreatment (Moreno et al., 2012). In this study, the effect of these three phenols at the concentration usually detected in wheat straw prehydrolysate (55, 22, and 44 mg/L for V, SA, and FA, respectively) was assessed in enzymatic hydrolysis in the presence of laccase. The effects of phenolic oxidation after laccase treatment were evaluated by measuring the glucose recovery after enzymatic hydrolysis of the model cellulose substrate (Sigmacell). In addition, polyethylene glycol (PEG) was used to study the possible mitigation of the cellulolytic inhibition after laccase treatment. On the other hand, to elucidate whether the inhibition on the enzymatic activities was caused by polymeric phenols products or phenoxyl radicals, laccase and vanillin were incubated in absence of cellulosic substrate, adding cellulases at initial time and after 30 h of incubation. Finally, the enzymatic hydrolysis of the same cellulosic substrate after laccase treatment was also studied in the presence of steam-exploded wheat straw prehydrolysate.

2. Methods

2.1. Materials

Wheat straw was supplied by CEDER-CIEMAT (Soria, Spain). The slurry obtained after steam explosion pretreatment at 200 °C for 10 min was vacuum-filtered. The prehydrolysate or liquid fraction was analyzed as described in the analytical methods and its chemical composition is shown in Table 1. After analysis, the liquid fraction was kept at 4 °C until use.

Vanillin (V1104), syringaldehyde (S7602), ferulic acid (128708), and polyethylene glycol (P3640) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). The phenolic compounds were supplemented at concentrations chosen in accordance to the concentrations detected in the wheat straw prehydrolysate after steam explosion (Table 1), i.e., vanillin (55 mg/L) (V), syringaldehyde (22 mg/L) (SA), and ferulic acid (44 mg/L) (FA).

Microcrystalline cellulose powder Sigmacell Type 50VR (Sigma S5504) was used as model cellulosic substrate for enzymatic hydrolysis.

2.2. Enzymes

Celluclast 1.5L, containing 60 FPU/mL of cellulase activity (NS50013), and Novo188 with 510 IU/mL of β -glucosidase activity (NS50010), both produced by Novozymes (Denmark), were used as hydrolytic enzymes. Celluclast 1.5L is a cellulase preparation with practically no β -glucosidase activity; therefore, the addition of Novo188 is needed for an efficient saccharification process. Commercial laccase from *Myceliophthora thermophila* (L) (NS51003; 127 IU/mL) was also supplied by Novozymes (Denmark).

Overall cellulase activity of Celluclast 1.5L was determined using filter paper (Whatman No. 1 filter paper strips), whereas β -glucosidase activity of Novo188 was measured using cellobiose as substrate (Ghose, 1987). Laccase activity was measured by the oxidation of 5 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) to its cation radical ($\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 100 mM sodium acetate (pH 5) at 24 °C. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that transforms 1 μmol of substrate per minute.

Enzyme loading in enzymatic hydrolysis assays was fixed at 5 FPU/g DW of substrate of Celluclast 1.5L, 5 IU/g DW substrate of Novo188 and 10 IU/g DW of substrate of *M. thermophila* laccase according to previously published results (Oliva-Taravilla et al., 2015). Taking into account the protein content in the enzyme cocktails, these loadings correspond to 12.5 mg protein/g DW, 2.0 mg protein/g DW, and 3.5 mg protein/g DW for Celluclast 1.5L, Novo188, and *M. thermophila* laccase, respectively.

2.3. Effect of phenols on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate after laccase treatment

The effect of laccase treatment on sugar release was evaluated by subjecting a model cellulosic substrate (Sigmacell) to enzymatic hydrolysis in the presence of phenols. All enzymatic hydrolysis assays were performed at 10% DW (w/v) of Sigmacell diluted in 50 mM citrate buffer at pH 5. All assays were run in triplicate in 100-mL flasks with 25 mL final volume at 50 °C and 180 rpm for 72 h. Representative samples were withdrawn periodically and centrifuged. Supernatants were analyzed for glucose concentration.

In a first set of experiments, depending on the process conditions (Table 2), cellulosic substrate, hydrolytic enzymes, laccase, and single phenolic compounds were added. In a second set of experiments, the same experimental procedure (as described above) was followed but the enzymatic hydrolysis was supplemented with different combinations of phenols (Table 3). The three phenols were added all together (V + SA + FA), or in pairs (V + SA, SA + FA or V + FA).

2.4. Enzymatic hydrolysis in presence of PEG

PEG at 5% DW (w/w) was added to the enzymatic hydrolysis of Sigmacell in presence of V. PEG was added at the start of the hydrolysis or after 30 h of incubation depending on the assay.

2.5. Cellulase and β -glucosidase activities in the presence of phenolic compounds

Enzymatic activities in the absence of substrate were assessed. Laccase and V were incubated in presence of Celluclast 1.5L or Novo188 at 50 °C for 72 h. The amount of cellulolytic enzymes was equivalent to the enzyme loading in enzymatic

hydrolysis. Celluclast 1.5L or Novo188 were added at 0 and 30 h of incubation. Total cellulase or β -glucosidase activities were determined as described in Enzymes section.

2.6. Native PAGE

For native gel analysis, the samples obtained after simultaneous incubation of hydrolytic enzymes in presence or absence of V with or without laccase for 72 h were used (in the Cellulase and β -glucosidase activities in presence of phenolic compounds section). Celluclast 1.5L and Novo188 mixtures were run in two separated native gels (Supporting Information 1 and 2).

Celluclast 1.5L and Novo188 cocktails were run as separately controls. All samples were concentrated three times in case for the gel with Celluclast 1.5L and 20 times for the gel with Novo 188 to favor bands visibility. Samples were mixed with 4x loading buffer (125 mM Tris HCl pH 6.8, 60% glycerol, 0.02% (w/v) Bromophenol blue). The mixture was then applied onto cooled 4–18% (w/v) polyacrylamide gradient gels and run at 40 mA constant current for 3 h in Mini-Protean Tetra Cell system (Bio-Rad, Hercules, CA). The running buffer was 25 mM Tris HCL, 192 mM glycine, pH 8.3. Subsequently, gels were fixed and stained using Coomassie Brilliant Blue R250.

2.7. Enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate in wheat straw prehydrolysate

Enzymatic hydrolysis assays were performed with 10% DW (w/v) of Sigmacell diluted in wheat straw prehydrolysate. Liquid fraction was used directly non-diluted or 50% (v/v) diluted in 50 mM citrate buffer at pH 5. The enzymatic hydrolysis was evaluated in terms of glucose and xylose recovery. All assays were run under the above specified conditions.

2.8. Analytical methods

Sugar and degradation compounds contained in the prehydrolysate were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). Sugar concentration was quantified in an Agilent 1260 chromatograph equipped with a refractive index detector (Agilent, Waldbronn, Germany). An Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA), operated at 50 °C with 5 mM H₂SO₄ as a mobile-phase (0.4 mL/min), was used for the separation. V, SA and FA were analyzed by HPLC with the

same column at 65 °C. Mobile phase was 89% 5 mM H₂SO₄ and 11% acetonitrile at 0.7 mL/min flow rate. For detection, a 1050A photodiode-array detector (Agilent, Waldbronn, Germany) was used.

Total phenolic content was determined according to a slightly modified version of the Folin-Ciocalteu method (Alvira et al., 2013).

3. Results and Discussion

3.1. Effect of laccase-oxidation of phenols on the hydrolysis of a model cellulosic substrate

The effect of laccase addition on sugar release was evaluated by subjecting a model cellulosic substrate (Sigmacell) to enzymatic hydrolysis in the presence of single phenols. Figure 1 shows the enzymatic hydrolysis of 10% DW (w/v) Sigmacell in the presence of V, SA, or FA without (Figure 1a) and with laccase treatment (Figure 1b). The rapid oxidation of phenols by laccase was confirmed by measuring phenols removal. Single phenols were non-detected after 4 h of hydrolysis by the effect of laccase (data not shown).

The control trail of enzymatic hydrolysis with laccase (Table 2, C+L) was run to evaluate the possible interaction between laccase and cellulases. In the absence of laccase, the possible effect of simple phenols on enzymatic hydrolysis was estimated (Figure 1a), whereas in the presence of laccase, the possible effect of laccase derived compounds was assessed (Figure 1b). When laccase was added without phenols (C+L), there was no difference in glucose release when compared with enzymatic hydrolysis without laccase (C).

In absence of laccase, after 72 h of hydrolysis, the glucose concentration reached similar values in all cases (Figure 1a). This result confirmed that the single phenols in the absence of laccases do not affect enzymatic hydrolysis at the concentrations tested. However, V and SA have been shown to be inhibitors of cellulases (Ximenes et al., 2010). Concentrations of V ranging from 10 to 20 g/L were reported to strongly inhibit cellulases during the hydrolysis of microcrystalline cellulosic substrate. In addition, with 30 g/L of V, cellulase activity loss was close to 50% (Li et al., 2014). However, such concentrations are far higher than the concentrations usually detected in steam-exploded wheat straw prehydrolysate. In presence of laccase (Figure 1b), enzymatic

hydrolysis was already affected after 24 h showing 46.6 and 32.6% less glucose recovery than assays without laccase, with V and SA, respectively. In fact, the presence of aldehyde group at C1 on the aromatic ring of SA and V could be participating in the stability and reactivity of the phenoxy radicals formed by oxidation of laccase (Andreu et al., 2013), making them more susceptible to react with the cellulolytic enzymes. However, the combination of FA with laccase did not show any effect on enzymatic hydrolysis. These results suggest that the laccase-derived products from a rapid oxidation of single phenols could be responsible for the inhibition effect; however, the level of inhibition would depend on the type of phenol.

Table 1. Composition of wheat-straw prehydrolysate

Component	Concentration (g/L)
Glucose (oligomeric)	3.48
Glucose (monomeric)	1.63
Xylose (oligomeric)	11.79
Xylose (monomeric)	4.24
Other monomeric sugars*	3.78
Acetic acid	13.35
Formic acid	10.45
HMF	0.33
Furfural	2.10
Vanillin	0.055
Syringaldehyde	0.022
Ferulic acid	0.044

*Mannose, galactose, and arabinose.

To evaluate whether the distinct oligomeric compounds formed from different combination of phenolic compounds after laccase treatment affect the enzymatic hydrolysis differently, an experiment was performed combining the three phenols (V + SA + FA) or in pairs (V + SA, V + FA or SA + FA) (Table 3). As Figure 2 shows, in all cases when V was present in the media, the glucose recovery at 72 h was lower than control samples. This reduction was comparable with the action of V alone with laccase observed previously (Figure 1b). Surprisingly, in the absence of vanillin (SA + FA assay), the glucose concentration at 72 h was similar to control samples. This finding would point out that there is no synergism between the effects of oxidized phenols, and that oxidized vanillin is the most inhibitory phenol. The different chemical structure of

phenols (Figure 3) and their different position of the substituents (ortho-, para-, meta-) in the benzene ring determine the mechanism of polymerization via laccase-catalyzed oxidation (Sun et al., 2013; Canfora et al., 2008).

Table 2. Experimental conditions to study the effect of single phenols on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate with or without laccase treatment

	Sigmacell	Hydrolytic Enzymes	Laccase	V	SA	FA
C	+	+	-	-	-	-
V	+	+	-	+	-	-
SA	+	+	-	-	+	-
FA	+	+	-	-	-	+
C+L	+	+	+	-	-	-
V+L	+	+	+	+	-	-
SA+L	+	+	+	-	+	-
FA+L	+	+	+	-	-	+

C: control assay; V: vanillin; SA: syringaldehyde; FA: ferulic acid; L: laccase.

Table 3. Experimental conditions to study the effect of mixture of phenols and laccase on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate

	Sigmacell	Hydrolytic Enzymes	Laccase	V	SA	FA
C	+	+	-	-	-	-
V+SA	+	+	-	+	-	-
V+SA	+	+	-	-	+	-
SA+FA	+	+	-	-	-	+
V+SA +FA	+	+	+	-	-	-

C, control assay; V, vanillin; SA, syringaldehyde; FA, ferulic acid.

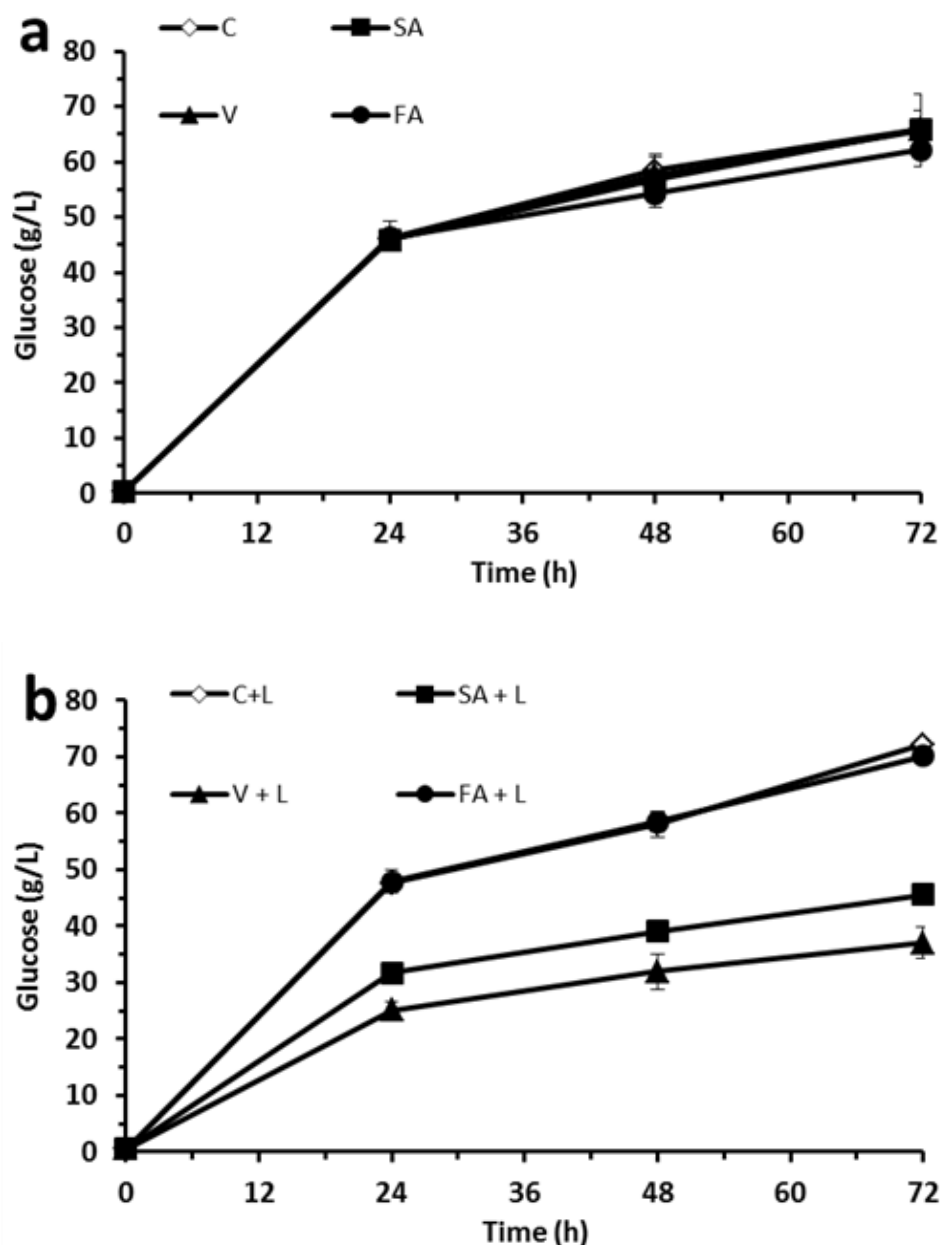


Figure 1. Enzymatic hydrolysis of Sigmacell (10% w/v) in the presence of vanillin (V), syringaldehyde (S) and ferulic acid (FA) without (a) or with (b) laccase. (L) Laccase. (C) Control samples without phenols and laccase.

The formation of a radical cation supposes the loss of an electron from O–H bond of the phenolic ring. Therefore, the maximum energy of the highest occupied molecular orbital (E_{HOMO}) represents a good approximation of the ionization potential of the molecule. The higher E_{HOMO} is, the easier the phenol is oxidized (Tanaka et al., 2010). Barneto et al. (2013) observed that SA showed a similar E_{HOMO} as FA due to the presence of two methoxy groups. When SA is combined with FA, due to their similar E_{HOMO} , they are more prone to react with each other and SA would act as a natural mediator coupling reactions. With only methoxy group in the aromatic ring, V showed the lowest E_{HOMO} of

three phenols, what would probably favor coupling reactions with enzymes. Because in this case SA would act as a mediator, the results were similar to those observed when FA was added alone. In this case, the structure of polymeric phenols and the mechanism of polymerization would be different, and therefore inhibition of enzymatic hydrolysis was not observed as occurred in Figure 1b.

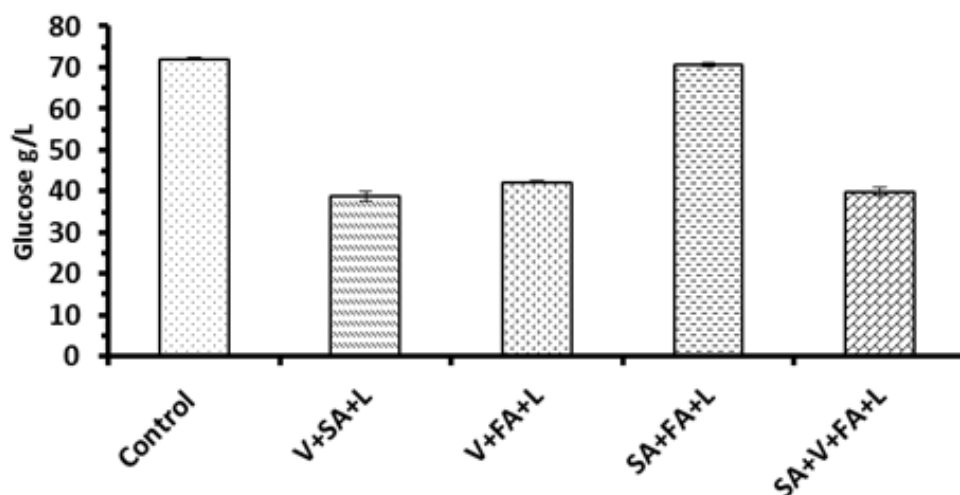


Figure 2. Glucose released at 72 h in Enzymatic hydrolysis of Sigmacell (10% w/v) in the presence of laccase and different combinations of phenols (V+SA, V+FA, SA+FA and V+SA+FA). Control: assay with laccase and without phenols.



Figure 3. Structure of phenolic compounds assayed in enzymatic hydrolysis.

3.2. Effect of PEG addition on enzymatic hydrolysis

Because V was shown to be the most inhibitory phenol either when added alone or in combination, PEG experiments and enzymatic activities were only assessed in the

presence of this phenol. PEG was added to the enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) Sigmacell in presence of V and laccase to check if it can mitigate the enzymatic inhibition observed upon phenolic polymerization of vanillin.

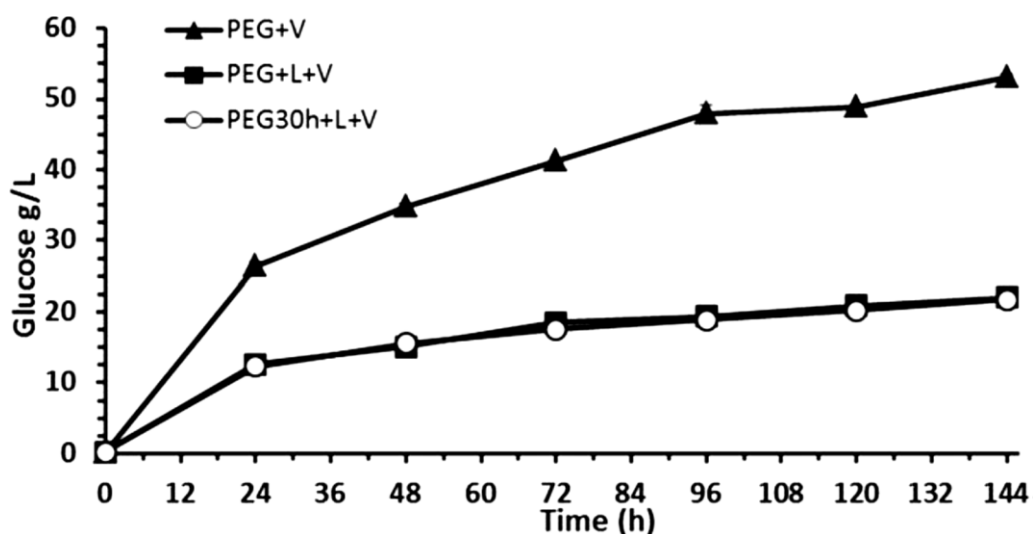


Figure 4. Enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) of Sigmacell in presence of vanillin and 5% (w/v) of PEG with or without laccase (V, vanillin; L, laccase).

PEG is described as a good additive to reduce the nonspecific bindings between cellulases and lignocellulosic substrates (Borjesson et al., 2007). Moreover, Tejirian and Xu (2011) showed that the addition of PEG4000 could mitigate the inhibition of cellulase caused by tannic acid, a polymeric phenolic compound. In this context, PEG (5% DW (w/w)) was added at the start, where the phenoxyl radicals are produced, or after 30 h, where the phenolic oligomeric compounds have already been formed to elucidate the cause of enzymatic hydrolysis inhibition.

When V was present together with laccase, the addition of PEG either at the beginning or at 30 h of hydrolysis could not mitigate the inhibitory effect of laccase-oxidized products compared with PEG+V samples without laccase (Figure 4). Under these conditions, when V is the only phenol present during the enzymatic hydrolysis, the unspecific binding between oligomeric phenols and the substrate or cellulolytic enzymes seemed not be the main reason for enzymatic hydrolysis inhibition.

3.3. Effect of laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds on the cellulase activity

Enzymatic activities were assessed to show whether oligomeric compounds or phenoxyl radicals formed during the laccase-catalyzed oxidation affect the hydrolytic enzymes in the absence of substrate.

Tejirian and Xu (2011) and Ximenes et al. (2011) reported that oligomeric phenols or complex-ramified phenols such as tannic acid were more inhibitory to cellulase activities than simple phenols. Phenolic oligomers formed after laccase-catalyzed oxidation could be forming complexes with cellulase that could lead to enzymes precipitation. To prove whether the inhibition of enzymatic hydrolysis was caused by the oligomeric compounds originated by laccase treatment or by the phenoxyl radicals formed during the laccase-catalyzed oxidation, two assays were performed (cellulolytic enzymes added at 0 or 30h of vanillin and laccase incubation, in the Cellulase and β -glucosidase activities in presence of phenolic compounds section). When cellulases, laccase and vanillin were added simultaneously, a reduction of 55 and 66% on cellulase and β -glucosidase activities was observed, respectively. This result confirmed that both cellulase and β -glucosidase were inhibited by laccase reaction products from V, even though not cellulose was present. On the other hand, when laccase and V were incubated for 30 h before addition of hydrolytic enzymes, in which case cross-reactivity of phenoxyl-radicals with cellulases was avoided, none of the cellulases activities were affected. After 30 h of V and laccase incubation, oligomeric phenols from V were already formed, however, they did not exert any inhibitory effect on the hydrolytic enzymes. These results would point to the phenoxyl-radicals (intermediates of the laccase reaction) rather than to the oligomeric phenols (end-product of laccase reaction) as actual inhibitors of enzymatic activities in the absence of substrate.

Non-denaturing PAGE was performed to visualize the possible formation of complexes between oligomeric compounds and cellulases (Celluclast 1.5L and Novo188). A delay in the protein motility would be expected when oligomeric phenols are coupled with enzymes. Incubating V and laccase with the cellulases, did not lead to differences in protein motility compared with cellulases and V, or cellulases and laccase incubations (Supporting Information 1 and 2). However, bands were more diffused in case of incubating V, laccase and Celluclast 1.5L (Supporting Information 1). This fact

could be explained by an apparent protein denaturalization which was more evident when V and laccase were incubated with Novo 188 because the samples were more concentrated (Supporting Information 2). The phenoxyl radical formed during laccase oxidation of V in presence of cellulase could act as oxidizing agents leading to cellulolytic enzymes denaturalization.

3.4. Effect of laccase-treated wheat straw prehydrolysate on enzymatic hydrolysis of model cellulosic substrate

To evaluate the effect of laccase treatment on the enzymatic hydrolysis in the presence of the complex mixture of phenols and other inhibitors (furans and carboxylic acids), wheat straw prehydrolysate was used directly or diluted to 50% (v/v) in enzymatic hydrolysis assays of 10% (w/v) DW Sigmacell. As Figure 5 shows, the glucose released after 72 h of hydrolysis in non-laccase treated prehydrolysate was 21.9 and 31.9 g/L for non-diluted and 50% diluted prehydrolysate, respectively. As expected, higher glucose release from Sigmacell was obtained when using 50% diluted prehydrolysate compared with non-diluted due to the lower amount of inhibitors in the diluted one. Compared with the assays where the 3 phenols were added together in presence of laccase (Figure 2, SA+V+FA+L), glucose release from Sigmacell was reduced by 58 and 32% in non-diluted and diluted prehydrolysate respectively. The much lower glucose recovery highlights the complexity of the inhibitors in the prehydrolysate.

Xylose hydrolysis efficiency from xylo-oligosaccharides in the absence of laccase was close to 85 and 100% for nondiluted and 50% diluted prehydrolysate assays, respectively. The xylose in diluted prehydrolysate after 72 h was higher than expected from the hydrolysis of xylo-oligosaccharides according to prehydrolysate composition (Table 1). This fact indicated that there was a slight xylose release from the model cellulosic substrate which cellulose composition is lower than 100%. These results pointed out that the xylanase components of the enzymatic cocktails (Celluclast 1.5L) were less susceptible to inhibitory compounds. Remarkably, laccase addition did not show a noticeable reduction of hydrolysis yields at 72 h in terms of glucose and xylose neither in diluted nor non-diluted prehydrolysate. This fact implied that the other components in wheat-straw prehydrolysate affect the enzymatic hydrolysis to a higher extent than the possible laccase-derived products.

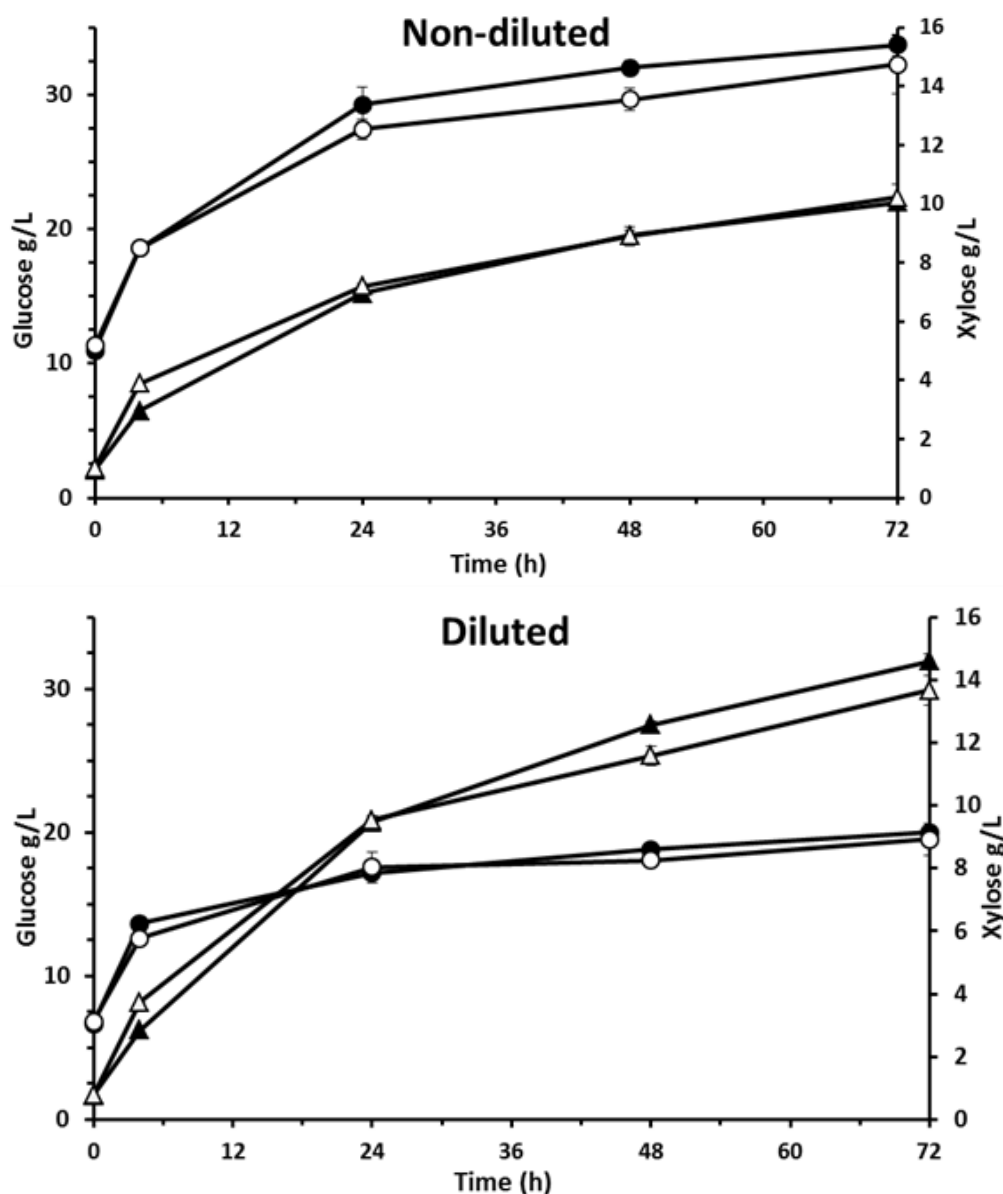


Figure 5. Enzymatic hydrolysis of Sigmacell (10% w/v) in presence of (a) non-diluted wheat-straw prehydrolysate and (b) 50% (v/v) diluted wheat-straw prehydrolysate.

▲ / △ Glucose ● / ○ Xylose. Open symbols, laccase treated prehydrolysates. Closed symbols, laccase nontreated hydrolysates. Note that potential xylose in 50% diluted hydrolysate is half of the amount present in non-diluted hydrolysate.

In addition to phenols, other components of the prehydrolysate are recognized as inhibitors of the cellulase activity, including monomeric sugars and xylo-oligosaccharides (Kim et al., 2011; 2013b). Interestingly, the glucose hydrolysis after 4 h of process was in all cases 24% higher in laccase-treated prehydrolysate than untreated prehydrolysate. This was in agreement with a fast phenolic oxidation by the action of laccase after 4 h, with 42 and 62% removal of total phenols in non-diluted and diluted prehydrolysates, respectively (data not shown). Kim et al (2011; 2013b)

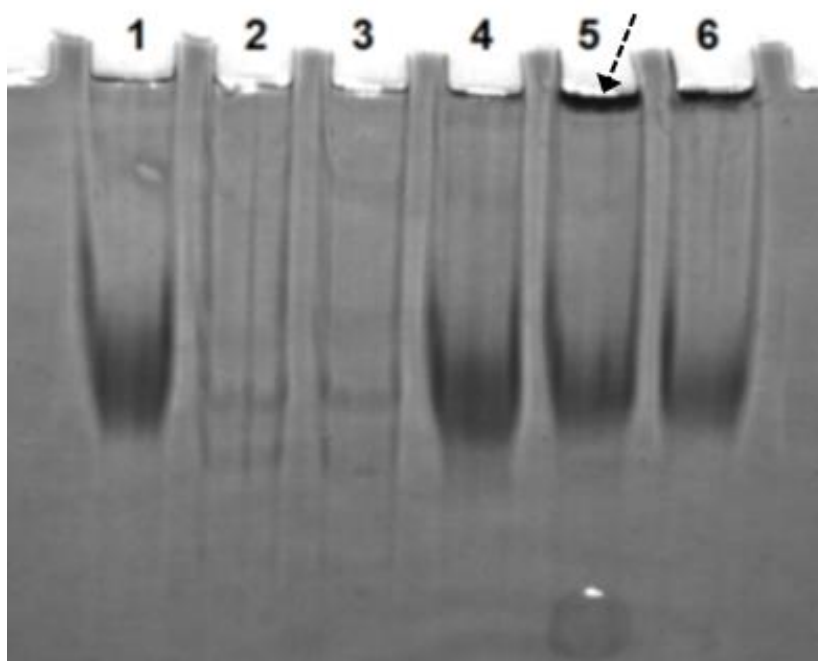
evidenced that phenolic compounds were potent cellulase inhibitors and their removal improved the final sugar yield in prehydrolysate from maple or liquid hot water and steam-pretreated poplar biomass. The higher glucose release in laccase treated assays at 4 h, suggested that under these conditions, the phenoxyl radicals would not be involved in the inhibition of enzymatic hydrolysis in which case cellulolytic enzymes would be deactivated along all the process. In this case, the complex composition of prehydrolysate, that contains multiple inhibitors, would have promoted coupling reactions of phenoxyl radicals with other components different than cellulases or formation of different laccase-derived oligomeric phenols.

4. Conclusion

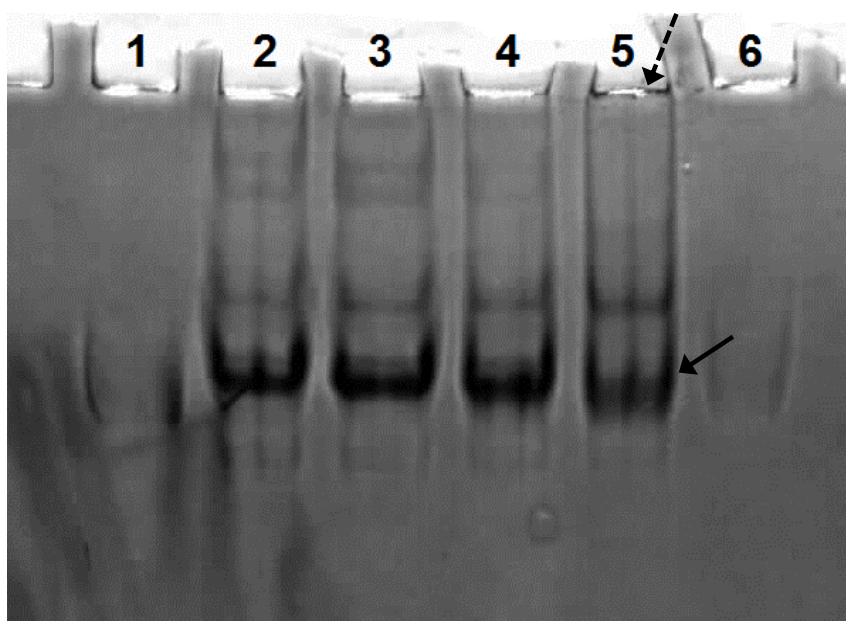
Application of laccases as phenolic detoxification approach would be an eco-friendly solution to reduce lag phase of the fermenting microorganism and improve the volumetric ethanol productivity. However, laccase-derived compounds affect negatively the enzymatic hydrolysis being the level of inhibition dependent on the type of phenol. Out of the three phenols tested, vanillin exhibited the strongest inhibition. Addition of PEG during enzymatic hydrolysis in presence of vanillin and laccase could not improve the hydrolysis. This fact suggested that unspecific unions between oligomeric vanillin compounds and cellulases or substrate were not the main reason for enzymatic hydrolysis inhibition. Furthermore, the strong decrease of cellulases activities in the absence of substrate, suggested that phenoxyl radicals formed by laccase oxidation of vanillin play an important role in the enzymatic inhibition. However, in presence of a complex mixture of phenols and other inhibitors (i.e., wheat-straw prehydrolysate), the phenoxyl radicals were not the main reason for the inhibition of the enzymatic hydrolysis. It can be concluded that phenoxyl radicals and oligomeric phenols are both influencing the enzymatic inhibition, and it is difficult to differentiate their individual influences. The assay conditions, the presence of insoluble substrate and the presence of complex inhibitors mixtures in wheat-straw prehydrolysate would determine the inhibitions mechanisms.

Appendix. Supporting Information

a.



b.



SD 1. Native gel 4-18% polyacrylamide gradient of the samples obtained after simultaneous incubation of hydrolytic enzymes (HE) in presence or absence of V with or without laccase for 72 h. (a) Novozymes188 mixture; (b) Celluclast 1.5L mixture. 1-LMt; 2-HE; 3-HE+V; 4-HE+LMt; 5-HE+LMt+V; 6- LMt+V. Arrows indicate apparently denaturalization of HE

References

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851-4861.
- Alvira, P., Moreno, A.D., Ibarra, D., Saez, F., Ballesteros, M., 2013. Improving the fermentation performance of *saccharomyces cerevisiae* by laccase during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high-substrate loadings. *Biotechnol. Progr.* 29, 74–82.
- Andreu, G., Vidal, T., 2013. Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* and phenolic compounds: Can the efficiency of an enzyme mediator for delignifying kenaf pulp be predicted? *Bioresour. Technol.* 131, 536-540.
- Barneto, A.G., Aracri, E., Andreu, G., Vidal, T., 2012. Investigating the structure-effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps. *Bioresour. Technol.* 112, 327-335.
- Borjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., Tjerneld, F., 2007. Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme Microb. Tech.* 41, 186-195.
- Canfora, L., Iamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase. *J. Agr. Food Chem.* 56, 1398-1407.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.* 59, 257-268.
- Ghoul, M., Chebil, L. 2012. *Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds by Oxidoreductases*. Netherlands: Springer.
- Haven, M.O., Jorgensen, H., 2013. Adsorption of beta-glucosidases in two commercial preparations onto pretreated biomass and lignin. *Biotechnol. for Biofuels* 6, 165.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100, 6378-6384.
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Tech.* 48, 408-415.
- Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2013. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresour. Technol.* 135, 30–38.
- Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S., 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme Microb. Tech.* 48, 195-208.

- Kudanga, T., Le Roes-Hill, M., 2014. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biot.* 98, 6525-6542.
- Li, Y., Qi, B., Wan, Y., 2014. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 167, 324-330.
- Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., Viikari, L., 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Tech.* 49, 492-498.
- Moreno, A.D., Tomás-Pejó, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., Olsson, L., 2013. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. *Bioresour. Technol.* 143, 337-343.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Fernández, J.L., Ballesteros, M., 2012. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresour. Technol.* 106, 101-109.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González A., Ballesteros, M., 2013. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresour. Technol.* 135, 239-245.
- Oliva, J.M., Negro, M.J., Sáez, F., 2006. Ballesteros I. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem.* 41, 1223-1228.
- Oliva-Taravilla, A., Moreno, A.D., Demuez, M., Ibarra, D., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2015. Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 175, 209-215.
- Sun, X., Bai, R., Zhang, Y., Wang, Q., Fan, X., Yuan, J., Cui, L., Wang, P., 2013. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds. *Appl. Biochem. Biotech.* 171, 1673-1680.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Hagino, H., Nudjima, S.I., Usui, H., Fujii, T., Taniguchi, M., 2010. Enzymatic oxidative polymerization of methoxyphenols. *Chem. Eng. Sci.* 65, 569-573.
- Tejirian, A., Xu, F., 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme Microb. Tech.* 48, 239-247.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Tech.* 46, 170-176.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Tech.* 48, 54-60.

Artículo 3

Phenols and lignin: key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase

Alfredo Oliva-Taravilla, Elia Tomás-Pejó, Marie Demuez, Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros

Journal of Biotechnology (2016) 218, 94–101

doi:10.1016/j.jbiotec.2015.11.004

Reproduced with permission from Elsevier.

Abstract

Phenols are known as inhibitors for cellulases and fermentative microorganisms in bioethanol production processes. The addition of laccases removes the phenolic compounds and subsequently reduces the lag phase of the fermentative microorganism. However, the application of laccases diminishes glucose release during the enzymatic hydrolysis. In this study a model cellulosic substrate (Sigmacell) together with lignin extract, whole steam-pretreated wheat straw (slurry) and its water insoluble solid fraction (WIS) were subjected to enzymatic hydrolysis to evaluate the effects of laccase treatment in presence of lignin and phenols. The presence of laccase in enzymatic hydrolysis of Sigmacell with lignin extract reduced glucose yield by 37% compared with assays without laccase. Furthermore, this reduction was even more marked in presence of phenols (55% reduction). Interestingly, when hydrolyzing WIS, the addition of phenols coupled with laccase treatment did not show a reduction when compared with only laccase addition. This fact suggests the key role of lignin in the hydrolysis inhibition since in WIS the ratio cellulase per gram of lignin was much lower than in Sigmacell experiments. Finally, the lower cellobiose and xylose recoveries point out that phenolic oligomers formed by laccase oxidation play important roles in the inhibition of endoglucanases, cellobiohydrolases and xylanases. To conclude, the proportion of lignin and the composition of phenols are key players in the inhibition of cellulases when the enzymatic hydrolysis is combined with laccases detoxification.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, laccase, lignin, phenols, ATR-FTIR, lignocellulose.

1. Introduction

Lignocellulosic materials such as agriculture residues, forest products or energy crops, are characterized as sustainable and abundant resources for bioethanol production. Lignocellulosic biomass consists mainly in three natural polymers: cellulose, hemicellulose and lignin. These three polymers form a recalcitrant structure that hampers the enzymatic hydrolysis of the lignocellulose. In this sense, an effective biomass-disrupting pretreatment is needed to increase the efficiency of the enzymatic hydrolysis. Among all pretreatment methods, steam explosion is one of the most widely employed technologies for pretreating lignocellulose for bioethanol production (Tomás-Pejó et al. 2011). During steam explosion, lignin is redistributed and hemicellulose is partially hydrolyzed and solubilized (Alvira et al. 2010a). The severe conditions applied during steam explosion trigger the formation of some inhibitory compounds, such as weak acids, furans derivatives and phenols, derived from partial sugar and lignin degradation. These compounds have been reported to inhibit enzymes activity and affect the viability and fermentative capacity of microorganisms (Kim et al. 2011; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

At the outlet of steam explosion two fractions are formed: the solubilized hemicellulose-rich slurry and the cellulose-rich solid fraction that are usually separated from each other by a costly step of filtration. After the separation of these two fractions, comes a second stage, where the solid product would be subjected to enzymatic hydrolysis to transform cellulose into free glucose. The use of the whole slurry, obtained after steam explosion pretreatment of lignocellulosic biomass, is a suitable alternative to increase the process cost-effectiveness. When the whole slurry is used, the water related economy expenses of the process is improved and the amount of fermentable sugars is increased due to the presence of hemicellulosic sugars that have been solubilized during the pretreatment. However, the presence of inhibitors limits the direct use of the whole slurry in bioethanol production processes. For this reason, the removal of inhibitory compounds is an interesting option for improving the enzymatic hydrolysis and the ethanol yields.

Laccases are multicopper-containing oxidases with phenoloxidase activity, which catalyze the oxidation of phenols generating unstable phenoxyl radicals that lead to the formation of higher molecular phenolic polymers and aromatic compounds

(Jönsson et al. 1998). Enzymatic detoxification with laccases has been successfully applied on slurries from steam-exploded wheat straw (Moreno et al. 2012, 2013a; Jurado et al. 2009). Moreno et al. (2013b) demonstrated that the laccase treatment removed phenolic compounds and subsequently reduced the lag phase of the fermentative microorganism.

When laccases are supplemented to the enzymatic hydrolysis there are controversial results depending on the lignocellulosic substrate used. It has been shown that laccase addition enhances glucose recoveries when the enzymatic hydrolysis is carried out on softwood (Moilanen et al. 2011; Moilanen et al. 2014) whereas decreased glucose recoveries are obtained when hydrolyzing hardwood or residual crops (Heap et al. 2014; Wang et al. 2013). Several studies have tried to explain the inhibitory mechanism of the oxidative polymerization of phenols mediated by laccases on enzymatic hydrolysis of agricultural residues (Wang et al. 2013; Moilanen et al. 2011) but unfortunately the inhibitory mechanism still remains unclear. Oliva-Taravilla et al. (2015a) tried to elucidate this mechanism by studying the effects of the oligomeric phenols and radicals formed via laccase oxidation on enzymatic hydrolysis of model cellulose (Sigmacell). It was shown that the oligomeric phenols and the phenoxyl radicals play an important role in the enzymatic inhibition (Oliva-Taravilla et al. 2015a).

Laccases also have the ability to oxidize the phenolic components of lignin (Oliva-Taravilla et al. 2015b; Sun et al. 2005b). Laccase splits the aromatic rings of phenols, resulting in the formation of new quinonoid structures (Witayakran et al. 2009; Shleev et al. 2006). The formation of these new substructures induces changes in the tridimensional structure of lignin (Martin-Sampedro et al. 2011), which could interact with the cellulosic polymer, increasing the number of lignin-cellulose interactions, and therefore, hampering the effective union of cellulases onto cellulosic fiber. With this in mind, the objective of this study was to find out whether the presence of lignin affected the enzymatic hydrolysis to a different extent than polymeric phenols and phenoxyl radicals when laccases were applied. In this work, the effect of single phenols and lignin oxidation via laccase was firstly assessed during the enzymatic hydrolysis of Sigmacell. Three phenols commonly found in the steam-exploded wheat-straw prehydrolysate were tested, including vanillin (V), syringaldehyde (SA) and ferulic acid (FA). Furthermore, the effect of single phenol (V, SA and FA) oxidation via laccase on enzymatic hydrolysis was also evaluated using the water insoluble solid fraction (WIS) of steam exploded wheat straw. The latter was compared with the enzymatic hydrolysis of the

whole slurry subjected or not to laccase treatment. Solids residues remaining after each enzymatic hydrolysis were recovered and analyzed by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) in order to determine chemical and structural changes in the fibers.

2. Materials and methods

2.1. Enzymes

The cellulolytic enzymes employed in this study were Celluclast 1.5L (NS50013, Novozymes A/S, Denmark), containing 60 FPU/mL of total cellulase activity and Novo 188 (NS50010, Novozymes 112 A/S, Denmark) with 510 CBU/mL of β -glucosidase activity. NS50013 preparation contains practically no β -glucosidase activity, thus, the addition of NS50010 is needed for an efficient saccharification process. Commercial laccase from *Myceliophthora thermophila* (NS51003) with 127 IU/mL was also supplied by Novozymes A/S (Denmark).

2.2. Materials

Wheat straw was supplied by CEDER-CIEMAT (Soria, Spain). The slurry was obtained after steam explosion pretreatment at 200°C for 10 min. WIS fraction was obtained by vacuum-filtering a portion of slurry and it was washed with distilled water. Slurry and WIS were analyzed as described in the analytical methods and their chemical compositions are shown in Table 1 and 2. After analysis, slurry and WIS were kept at 4 °C until use.

Microcrystalline cellulose powder Sigmacell Type 50® (S5504) was used as model cellulosic substrate for enzymatic hydrolysis. Vanillin (V1104), syringaldehyde (S7602) and ferulic acid (128708) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (MO, USA). Lignin residue was obtained after 136 h enzymatic hydrolysis 10% (w/v) WIS at 50 °C in presence of 15 FPU/g dry weight (DW) of substrate of NS50013 and 15 CBU/g DW substrate of NS50010 to reach complete enzymatic hydrolysis. The residues were obtained by centrifugation, washed in distilled water and finally dried at room temperature.

2.3. Enzymatic hydrolysis

Sigmacell, WIS or slurry at 10% (w/v) DW diluted in 50mM citrate buffer at pH 5, were used as substrates for enzymatic hydrolysis. When laccase treatment was performed *M. thermophila* laccase was added at 10 IU/g DW of cellulosic substrate according with previous results (Oliva-Taravilla et al. 2015a). Cellulolytic enzyme loading for enzymatic hydrolysis assays was 5 FPU/g DW of cellulosic substrate for both NS50013 and NS50010. All assays were run in triplicate in 100 mL-flasks at 50°C and 180 rpm for 72 h. Representative samples were withdrawn periodically, centrifuged and kept at -20 °C until analysis. Supernatants were analyzed for glucose, xylose and cellobiose concentration.

For studying the effect of lignin and phenols on enzymatic hydrolysis of Sigmacell, lignin extract was added to the enzymatic hydrolysis at the ratio 2:1 (Sigmacell:lignin). This ratio was selected in concordance with the proportion of cellulose:lignin commonly found in slurries (Oliva-Taravilla et al. 2015a). The phenolic compounds were supplemented in accordance to Oliva-Taravilla et al. (2015a), i.e. vanillin (55 mg/L) (V), syringaldehyde (22 mg/L) (SA) and ferulic acid (44 mg/L) (FA). Cellulolytic enzymes, laccase, phenolic compounds and lignin extract were added simultaneously.

The same amount of phenols was used to study the effect of single phenol oxidation via laccase on enzymatic hydrolysis of the WIS fraction. The cellulolytic enzymes, laccase, phenolic compounds and WIS were added simultaneously. In the third set of experiments, the whole slurry was used. In this case, the assays were not supplemented with any phenol since slurry already contains a complex mixture of phenolic compounds in the liquid fraction.

2.4. Analysis by ATR-FTIR

Residual solids obtained after enzymatic hydrolysis were recovered by centrifugation and were analyzed by ATR-FTIR. The FTIR spectrometer used was the Nicolet 6700 spectrometer (ThermoScientific, USA) with an ATR accessory and deuterated triglycine sulfate detector. Spectra were collected at room temperature in the 2000-800 cm^{-1} range with a 1.9 cm^{-1} resolution and being an average of 32 scans. In order to make spectra clearer, each FTIR spectrum obtained from an assay without laccase was subtracted to the corresponding FTIR spectrum from a laccase-treated

assay. Similarly, each FTIR spectrum obtained from a laccase-treated assay without phenols was subtracted to the corresponding FTIR spectrum from an assay with both laccase and phenols.

2.5. Analytical methods

The chemical composition of the WIS fraction and slurry was analyzed using the National Renewable Energy Laboratory (NREL) standard methods for determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP-002, LAP- 003, and LAP-019) (Sluiter et al. 2010).

Sugars, phenols and degradation compounds contained in the prehydrolysate were determined and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) in an Agilent 1260 chromatograph (Agilent Technologies, Germany) according to Oliva-Taravilla et al. (2015a).

When required, statistical analyses were performed using a two-sample t-test with $\alpha=0.05$ between assays.

3. Results and discussion

3.1 Effect of lignin extract and phenols on enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose in presence of laccase

Figure 1a shows the enzymatic hydrolysis of Sigmacell in presence of V, SA or FA and lignin extract without laccase. Remarkably, the combination of lignin and phenols in absence of laccase caused a 25% decrease of glucose hydrolysis compared with enzymatic hydrolysis assay conducted on Sigmacell (Sg) and lignin without phenols. Oliva-Taravilla et al. (2015a) evidenced that in absence of lignin the same concentration of phenolic compounds did not affect the enzymatic hydrolysis of Sigmacell reaching around 66 g/L in all cases. This fact confirms the key role of lignin in the inhibition of enzymatic hydrolysis in presence of phenols. In this context, the decline of glucose recovery observed when simple phenols are supplemented (Figure 1a) is not only due to the adsorption effect of lignin (Pareek et al. 2013), but to a synergic effect between the action of simple phenols and lignin in the deactivation of cellulases. It is worth to mention that the amount of phenols increased along the enzymatic hydrolysis in the absence of laccase due phenols release from the lignin.

There were 0.02 g/L of phenols at the end of hydrolysis in the Sigmacell plus lignin assays without laccase which corroborated the partial lignin degradation. Furthermore, all three phenols were detected after 4 h of enzymatic hydrolysis even when V, SA or FA were added individually. The increased amount of phenols in the media would explain the lower enzymatic hydrolysis yield when lignin is present.

Table 1. Composition of wheat straw prehydrolysate

Component	Concentration (g/L)
Glucose	3.7
Xylose	12.9
Galactose	1.3
Arabinose	0.9
Mannose	0.7
Acetic acid	13.3
Formic acid	9.5
HMF	0.3
Furfural	0.5
Vanillin	0.053
Syringaldehyde	0.026
Ferulic acid	n.d
Coumaric acid	0.003

n.d: Not detected

Table 2. Composition WIS of wheat straw

Component	% (w/w)
Glucose from cellulose	55.4
Xylose*	5.4
Galactose*	0.2
Arabinose*	0.3
Mannose*	0.3
Acid insoluble lignin	35.6
Ash	5.3

* Sugars from hemicellulosic fraction

The effect of laccase addition in combination with V, SA or FA and lignin extract on sugar release is shown in Figure 1b. In the assay without phenols (Sg+L), 41.5 g/L of glucose were released which implies 37% less glucose than in control assay without laccase (Sg). These results pointed out that laccase treatment could be inhibiting the enzymatic hydrolysis by altering directly the structure of lignin and strengthening the lignin-cellulose interactions as suggested by Moilanen et al. (2011).

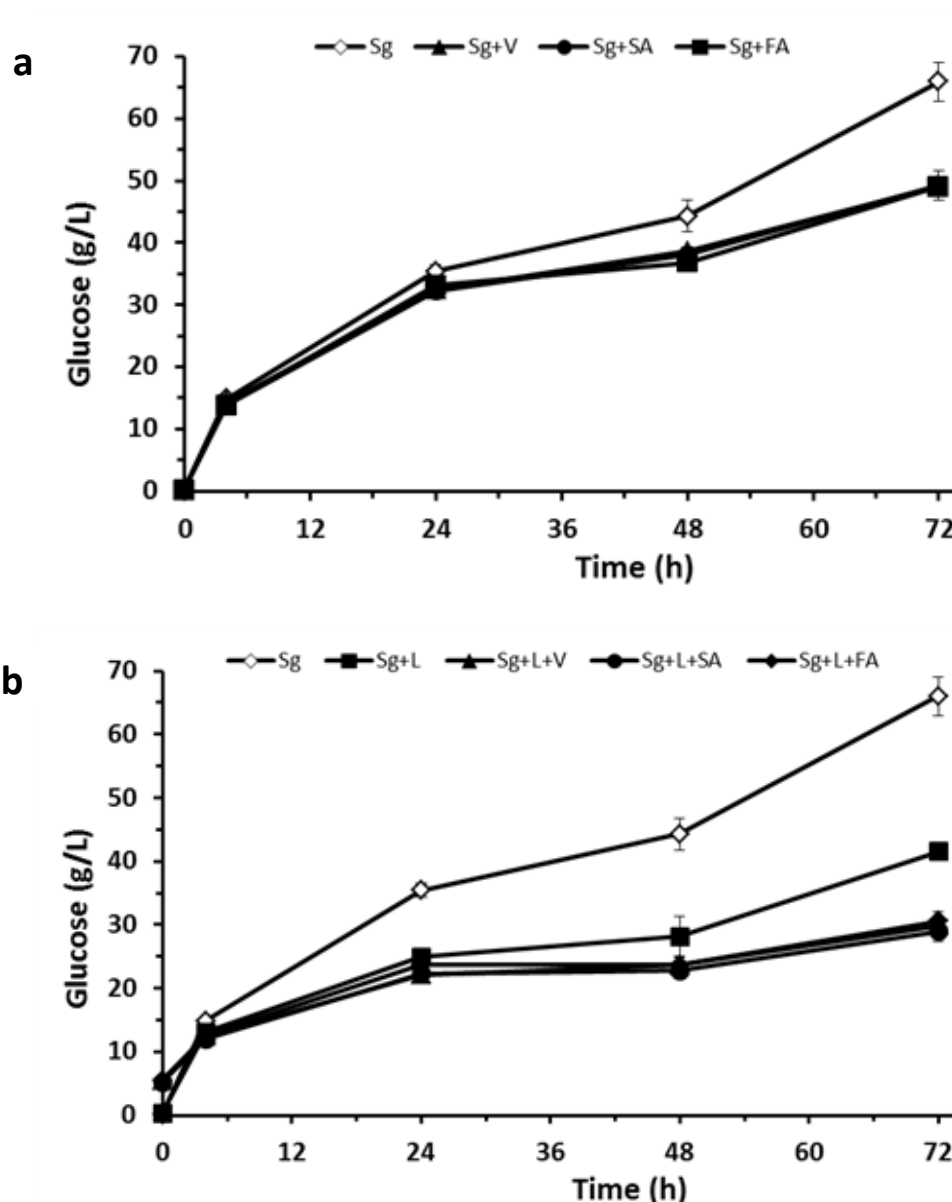


Figure 1. Enzymatic hydrolysis of Sigmacell in presence of lignin extract (ratio Sg:lignin 2:1), without (a) or with (b) laccase and single phenols according to table 3; Sigmacell (Sg); laccase (L); vanillin (V); syringaldehyde (SA); ferulic acid (FA).

Indeed, the corresponding FTIR spectrum subtraction (Sg+L)-(Sg) (Figure 2) shows a marked intensity reduction in the band 1512 cm^{-1} attributed to aromatic ring vibrations of lignin due to aromatic skeletal vibration ($\text{C}=\text{C}$). This reduction in the intensity confirms the ability of laccase to oxidize the phenolic units present in the lignin (Oliva-Taravilla et al. 2015a; Liu et al. 2014).

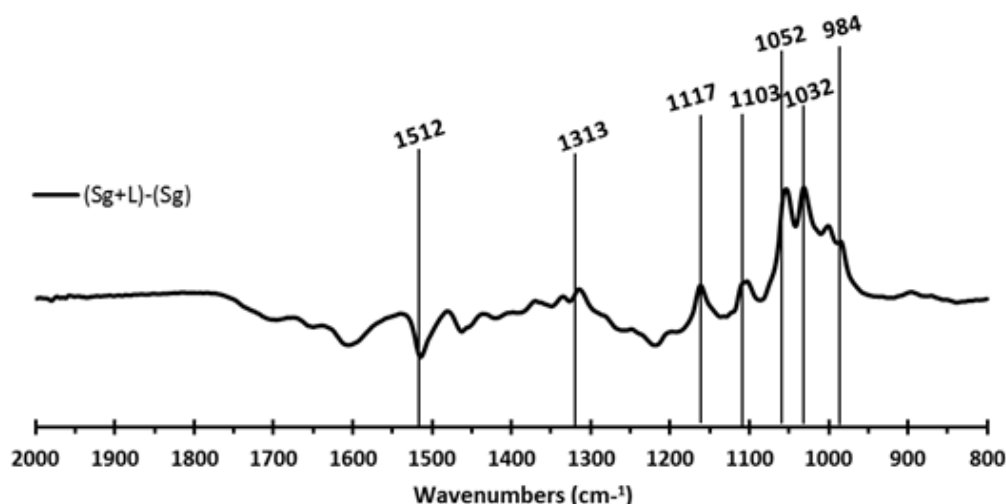


Figure 2. Subtraction of FTIR spectra from enzymatic hydrolysis assays of Sigmacell and lignin with laccase (Sg+L) minus the control assay without laccase (Sg): (Sg+L)-(Sg).

In the case of assays conducted with phenols, the FTIR spectra subtraction (Sg+L+Phenol)-(Sg+L) did not show significant differences compared to the FTIR spectra subtraction (Sg+L)-(Sg). Nevertheless, when V, FA or SA was added with laccase and lignin, glucose release was about 30 g/L in all cases (Figure 1b). This value represents 28% less glucose release when comparing with only laccase addition (41.5 g/L, Sg+L) and 55% reduction when compared with assays without laccase (66 g/L). Oliva-Taravilla et al. (2015a) previously evidenced the individual role of oligomeric phenols and phenoxyl radicals formed by laccase oxidation in the inhibition of enzymatic hydrolysis. Here, this reduction in glucose yields suggests that there is a synergistic effect between the polymeric phenols and the lignin modifications generated by laccase oxidation.

The inhibitory effect of oligomeric phenols towards enzymatic hydrolysis was supported by the cellobiose hydrolysis data (Figure 3). Four hours of enzymatic hydrolysis were enough to show a marked reduction in cellobiose release of 31% and 40% in laccase-treated (Sg+L) and laccase plus phenols assays, respectively, compared to control without laccase (Sg). For all laccase-treated assays, cellobiose was not detected at 24 h of enzymatic hydrolysis, thus this result corroborated that the endoglucanases and cellobiohydrolases were inhibited in a greater extent than β -glucosidases during the initial stages of hydrolysis (Ximenes et al. 2011; Moilanen et al. 2011). Interestingly, a slight increase in cellobiose hydrolysis was observed from 48 h onwards in the assay with laccase and without phenols (Sg+L) corresponding to higher glucose release at the same time point (Figure 1b, Sg+L). The increase in cellobiose

concentration could be due to the participation of other enzyme activities present in the cellulolytic enzymatic cocktails that breakdown lignin along the hydrolysis favoring cellulose hydrolysis. Indeed, there were 0.02 g/L of phenols at the end of hydrolysis in the Sigmacell plus lignin assays without laccase which corroborated the partial lignin degradation.

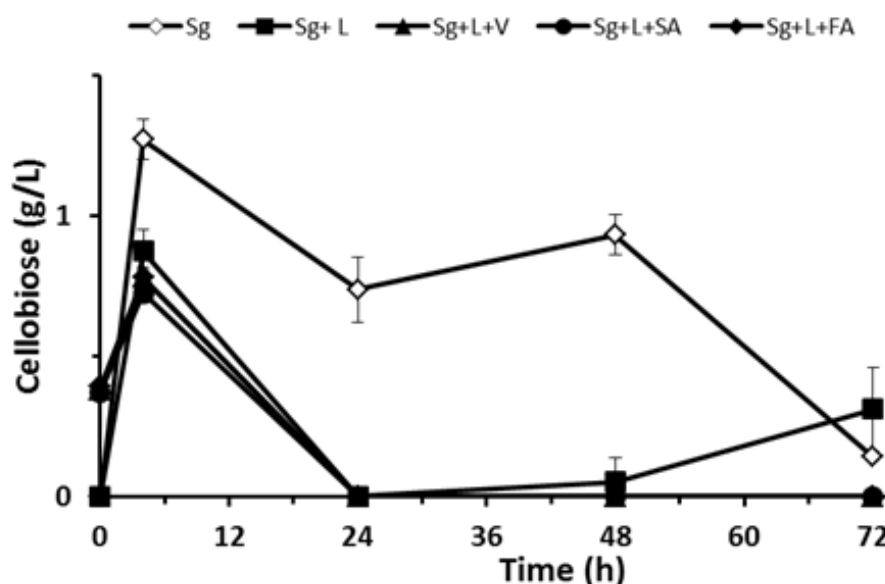


Figure 3. Cellobiose recovery in enzymatic hydrolysis assays of Sigmacell in presence of lignin extract (ratio Sg:lignin, 2:1), with or without laccase and single phenols according to table 3; Sigmacell (Sg); laccase (L); vanillin (V); syringaldehyde (SA); ferulic acid (FA).

3.2 Effect of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of WIS fraction in presence of phenols

Similarly to the experiment conducted previously with Sigmacell, WIS was used as substrate during this experiment. In a first experiment, the addition of simple phenols without laccase did not affect the enzymatic hydrolysis of WIS compared with the control assay (W) (data not shown). This result seems contradictory with previous results showed in Figure 1a. However, it is important to consider the relation of cellulases dosage to lignin content in both assays. The ratio was 10 FPU/g lignin and 10 CBU/g lignin in the enzymatic hydrolysis of Sigmacell because the enzyme loading was 5 FPU/g DW cellulosic substrate and lignin was added at ratio 2:1 (Sg:lignin). On the other hand, in enzymatic hydrolysis of WIS the ratio was 40% higher (14 FPU/g lignin) because the lignin content in WIS was 35.6% (w/w) (Table 2). The assay containing higher ratio cellulase to lignin, i.e. case of WIS, after certain amount of cellulase adsorbed into lignin there would be more free and active enzymes. Thus, the effect of

the phenol addition on enzymatic hydrolysis would be counteracted by the higher free and active cellulolytic enzymes.

In a second experiment, the released glucose in WIS treated with laccase with or without phenols was in the range of 16.8-18.4 g/L, corresponding to 31.5-37.5% less glucose release, while the glucose release in the control assay (W) without laccase and phenols was 27 g/L (Figure 4a). The addition of phenols coupled with laccase treatment did not show a reduction when compared with only laccase addition. This result suggests that, under these conditions, the lower glucose recoveries were caused in a greater extent caused by the modified lignin by laccase rather than by the polymeric phenols.

It is known that NS50013 cocktail has a secondary xylanase activity (Alvira et al., 2010b), therefore xylose hydrolysis was studied as indicator of the inhibition of this activity. After 72 h of enzymatic hydrolysis in control assay without laccase or phenols (W), xylose release was 4.3 g/L (Figure 4b), accounting for 80% xylose hydrolysis yield. Regarding glucose hydrolysis, no significant differences were observed when the different phenols were added to the enzymatic hydrolysis in absence of laccase. The assays supplemented with laccase ranged 49-55% xylose hydrolysis yield regardless the addition or not of phenols (Figure 4b). While no differences in glucose release were observed at 4 h, xylose release at this time point was 33% and 42% lower in presence of laccase, and phenols plus laccase, respectively. This fact indicated that under these conditions, at early stages the xylanase activity was more affected by laccase treatment than cellulase activity. By contrast, Oliva-Taravilla et al. (2015a) evidenced that in absence of lignin, xylanase activity was less affected than cellulase activity when hydrolyzing Sigmacell diluted in steam-pretreated wheat straw prehydrolysate. These results indicated again the key role of the lignin in enzymatic hydrolysis inhibition in presence of laccase. When enzymatic hydrolysis was coupled with laccase treatment, cellobiose release at 4 h was 79% lower than in control assay without laccase (W) (Figure 5). The reduction of cellobiose hydrolysis was even higher in presence of phenols which could be attributed to the inhibitory effect of polymeric phenols upon free cellulases and more specifically the endoglucanases and cellobiohydrolases. In addition, the reduction level was dependent on the studied phenol.

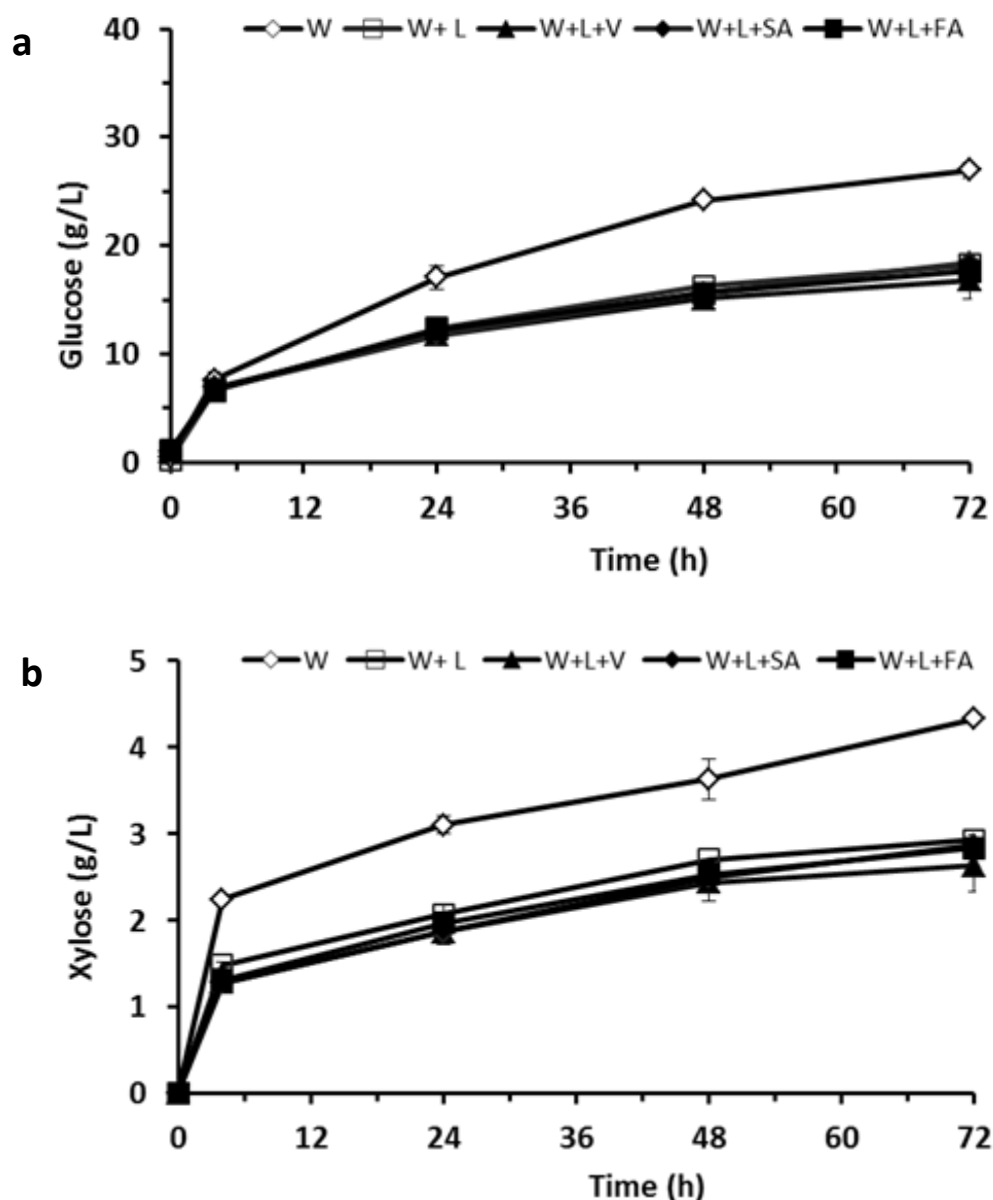


Figure 4. Enzymatic hydrolysis of WIS with or without laccase and single phenols according to table 4; (a) Glucose recovery; (b) Xylose recovery; WIS (W); laccase (L); vanillin (V); syringaldehyde (SA); ferulic acid (FA).

The number of substituents and their position in the aromatic ring determines the linkage in the oxidative polymerization (Aracri et al. 2010; Sun et al. 2013). In this context, in presence of FA, cellobiose hydrolysis was 95% lower than the control assay. This value was statistically different to 92% and 90% reduction, obtained in presence of SA and V, respectively.

The FTIR subtraction spectrum from WIS treated with laccase (W+L)-(W) (Figure 6a) displayed intensity differences at the same frequencies than when Sigmacell and lignin were treated with laccase (Sg+L)-(Sg) (Figure 2). The lower intensities

observed for WIS at 1512, 1162 cm^{-1} and carbohydrate region, were due to the lower lignin content. In our previous work, the FTIR spectrum of laccase-treated steam-exploded WIS fraction exhibited higher intensity values at 1162 cm^{-1} in comparison to the spectrum of non-laccase treated WIS residues (Oliva-Taravilla et al. 2015b). Although, the amount of lignin in both WIS substrates was similar (35.6% and 33.6% (w/w)), in the present study, the evaluation of the inhibitory effect of the laccase treatment was made using washed WIS fraction. For this reason, the amount of free phenols embedded in the washed WIS lignocellulosic fibers was negligible, compared with unwashed WIS. The absence of phenols would avoid the potential crossed-reactions between phenols and lignin (Rico et al. 2014).

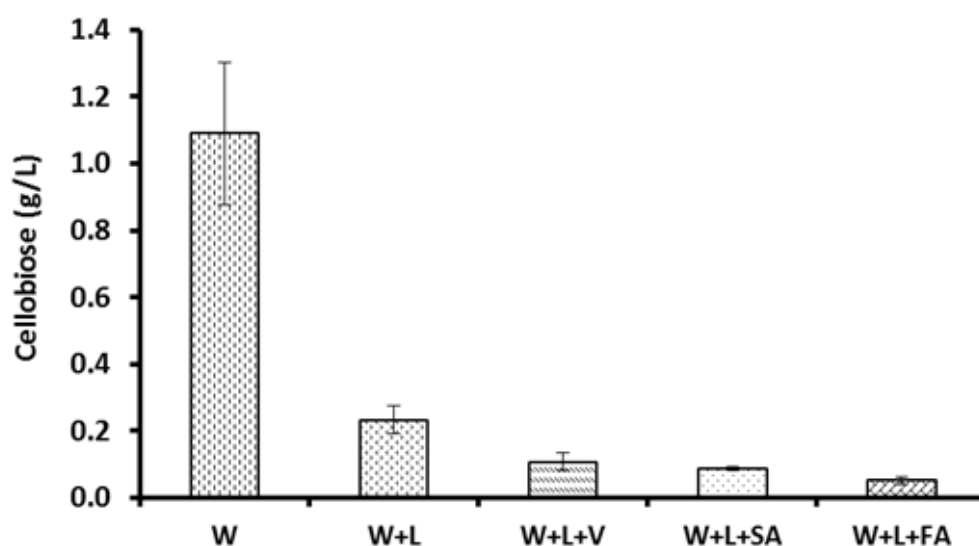
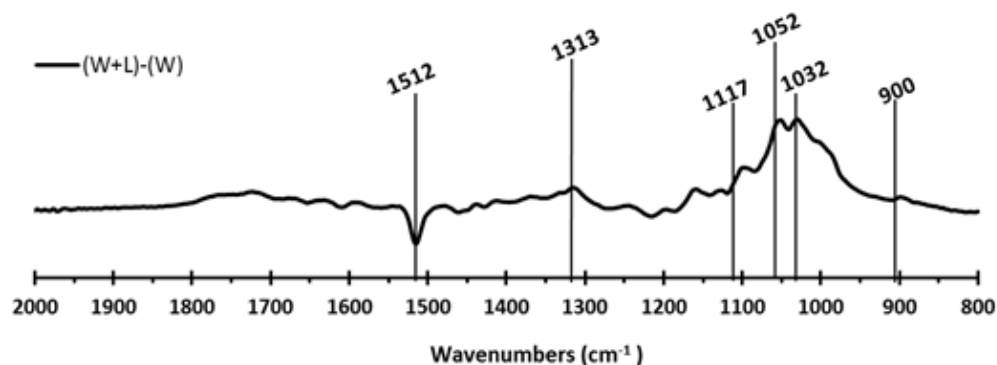


Figure 5. Cellobiose recovery at 4 h of enzymatic hydrolysis of WIS with or without laccase and single phenols according to table 4; WIS (W); laccase (L); vanillin (V); syringaldehyde (SA); ferulic acid (FA).

In the case of WIS assays with phenols and laccase, almost no differences in the carbohydrate regions were found between the FTIR spectra subtractions of the assays containing V or SA, (W+L+V)-(W+L) and (W+L+SA)-(W+L) (Figure 6b). Slight differences were found at band ranges corresponding to lignin bonds from 1600-1110 cm^{-1} . Noticeable differences were observed on the FTIR spectra subtractions of the assay containing FA.

a



b

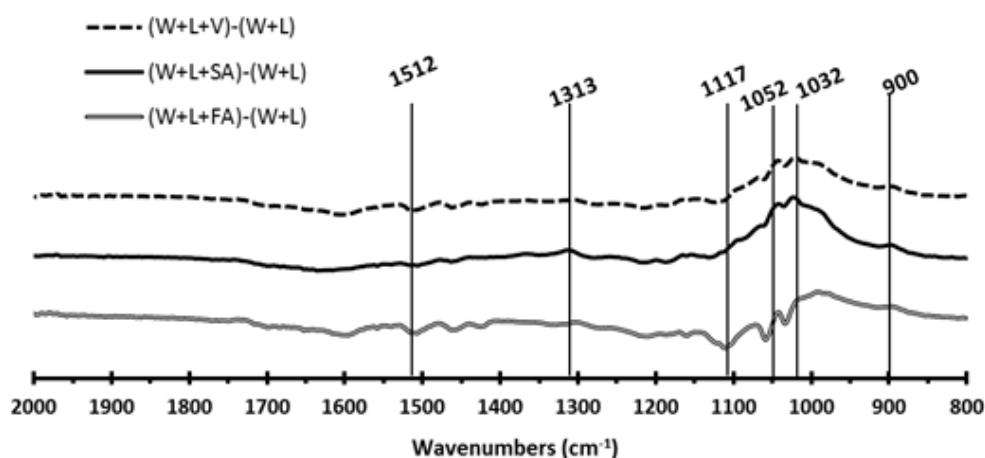


Figure 6. Subtraction of FTIR spectra from the residues of enzymatic hydrolysis assays of WIS with or without laccase and single phenols; (a) Resulting spectrum of the FTIR subtraction of sample treated with laccase (W+L) minus the control sample without laccase (W): (W+L)-(W); (b) Resulting spectrum of the FTIR subtraction of sample with laccase and phenols (W+L+Phenol) minus the sample treated with laccase (W+L): blue (W+L+V)-(W+L); red (W+L+SA)-(W+L); green (W+L+FA)-(W+L).

Lower intensity values were exhibited in the carbohydrate region (1117-1032 cm⁻¹) (Figure 6b). Oliva-Taravilla et al. (2015b) hypothesized that the lower glucose recoveries in enzymatic hydrolysis in presence of laccase were mainly caused by grafting process of FA radicals onto lignin. The absence of embedded phenols probably could cause a different behavior of FA. This fact is corroborated by Canfora et al. (2008) who observed different reactivities of laccase to phenols depending on their combination.

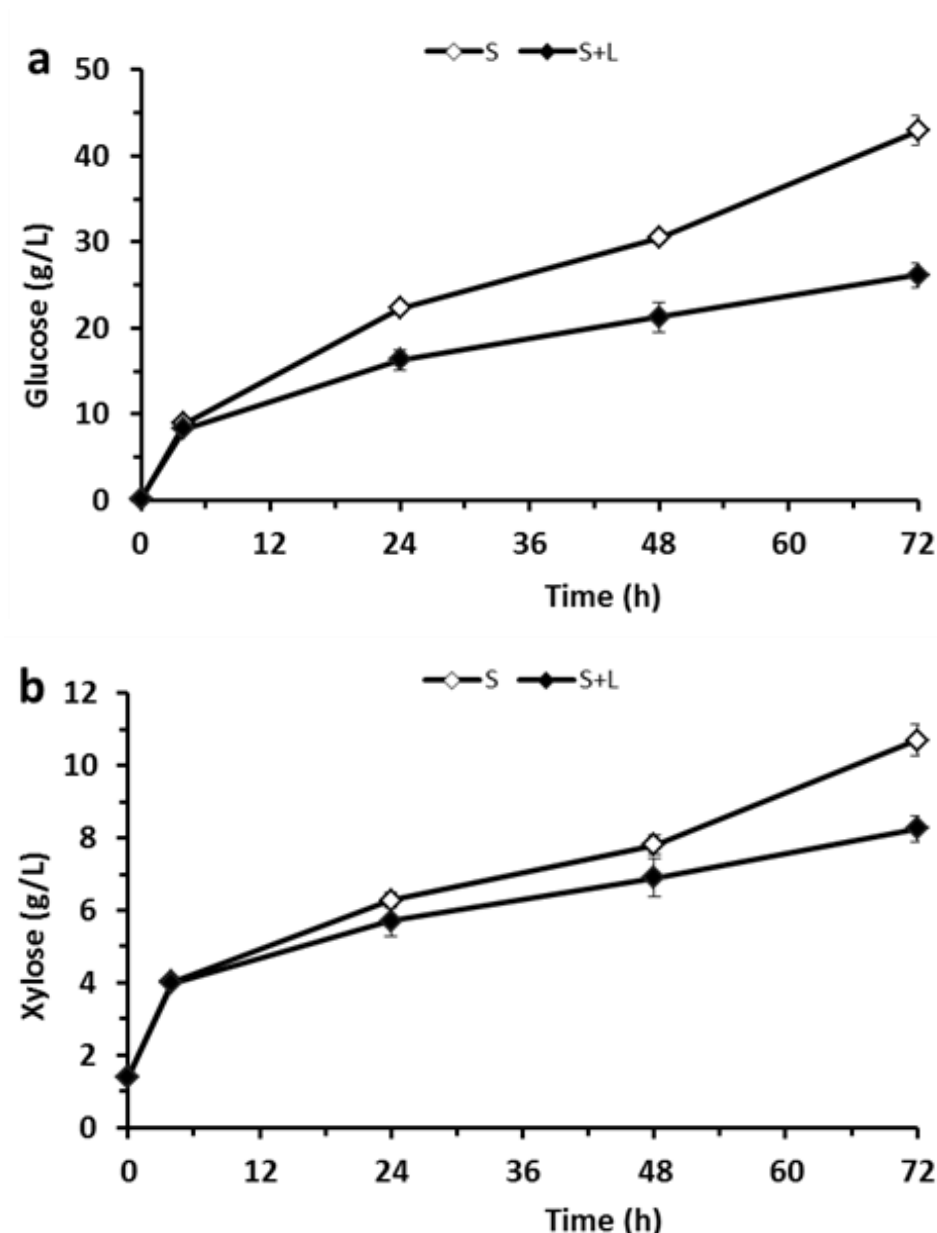


Figure 7. Enzymatic hydrolysis of slurry with or without laccase; (a) Glucose recovery (b) Xylose recovery; slurry (S); laccase (L).

3.3 Effect of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of slurry

As it is shown in Figure 7a, a significant difference was observed at 24 h hydrolysis in terms of glucose release (27% decrease) when comparing laccase treated and non-treated assays. Furthermore, this difference increased to 39% at 72 h. This value was slightly higher than the observed for WIS (32% reduction). These results indicated that besides lignin, the complex mixture of phenolic compounds present in the slurry and the variety of crossed-reactions of the radicals formed by laccase oxidation contributed to enzymatic hydrolysis inhibition.

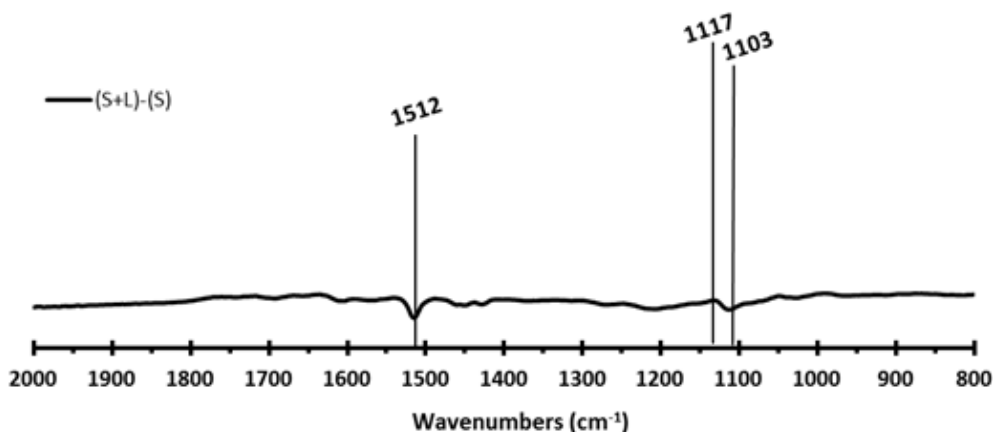


Figure 8. Subtraction of FTIR spectra from the residues of enzymatic hydrolysis assay of slurry with laccase (S+L) minus the control assay without laccase (S): (S+L)-(S); slurry (S); laccase (L).

In contrary to the xylose released in WIS assays (Figure 4b), no differences were observed in xylose recoveries at 4-24 h (Figure 7b). However, 23% less xylose release was observed in laccase assays compared with the assays without laccase after 72 h (Figure 7b). From these results it could be concluded that laccase treatment had more impact on WIS than in slurry assays in terms of xylose hydrolysis yields. The differences were attributed to the fact that almost all xylo-oligomers are soluble in the slurry and thus, the hydrolysis of soluble oligomers was easier than insoluble xylan in the WIS. The FTIR spectra subtraction of the residues resulting from the enzymatic hydrolysis of slurry (S+L)-(S) is shown in Figure 8. Band intensity at 1512 cm^{-1} was similar to the laccase-treated Sigmacell plus lignin (Sg+L)-(Sg), which were more marked than in case of WIS assays. Remarkably, the characteristic changes due to laccase treatment, namely intensity differences at 1160 cm^{-1} and at the carbohydrate region ($1032\text{--}1117\text{ cm}^{-1}$) were not observed. Again, this result could be due to the complex composition of slurry and the lower lignin content present in this case (0.65%) compared to WIS (3.5%) and Sigmacell plus lignin assays (5%). As a consequence, the multiple phenolic compounds would promote high variety of oxidative polymerization reactions.

4. Conclusion

Enzymatic detoxification with laccases has been reported as an efficient method to remove the phenolic compounds in steam-pretreated lignocellulosic materials. This approach leads to reduce the lag phase of the fermentative

microorganism and improves volumetric productivities in ethanol production processes. However, the application of laccases during the enzymatic hydrolysis showed lower sugars yields. The oxidation of lignin catalyzed by laccase induces an inhibitory effect on the enzymatic hydrolysis. The amount of free and active enzyme, which is highly related to the ratio of cellulase dosage to lignin content, has a critical role when laccases are applied. Besides lignin cellulase adsorption, laccase treatment promotes a synergistic effect in which phenolic oligomers are also interacting with the hydrolytic enzymes where endoglucanases, cellobiohydrolases and xylanases are more affected. As a consequence, alternative strategies should be designed to improve enzymatic hydrolysis in laccase detoxified materials. This would include the application of separated enzymatic hydrolysis prior to the detoxification process.

Acknowledgements

Dr. Ignacio Ballesteros (CIEMAT) is greatly acknowledged for helping in the pretreatment and characterization of wheat straw. Elia Tomás-Pejó acknowledges the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n° 291803.

References

- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ (2010a) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technol*, 101: 4851-4861.
- Alvira P, Negro MJ, Sáez F, Ballesteros M (2010b) Application of a microassay method to study enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. *J Chem Technol Biotechnol*, 85:1291-1297.
- Aracri E, Fillat A, Colom, JF, Gutiérrez A, del Río, JC, Martínez TT, Vidal, T (2010) Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases. *Bioresource Technol* 101:8211-8216.
- Heap L, Green A, Brown D, Van Dongen B, Turner N (2014) Role of laccase as an enzymatic pretreatment method to improve lignocellulosic saccharification. *Catal Sci Technol* 4:2251-2259.

- Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B (1998). Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Appl Biochem Biotechnol 49:691-697.
- Jurado M, Prieto A, Martinez-Alcala A, Martinez AT, Jesus Martinez M (2009) Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. Bioresource Technol 100:6378-6384.
- Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, Ladisch MR (2011) Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. Enzyme Microb Tech 48:408-415.
- Martin-Sampedro R, Capanema EA, Hoeger I, Villar JC, Rojas OJ (2011). Lignin Changes after Steam Explosion and Laccase-Mediator Treatment of Eucalyptus Wood Chips. J Agric Food Chem 59:8761-8769.
- Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L (2011) The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. Enzyme Microb Tech 49:492-498.
- Moilanen U, Kellock M, Várnai A, Andberg M, Viikari L (2014). Mechanisms of laccase-mediator treatments improving the enzymatic hydrolysis of pre-treated spruce. Biotechnol Biofuels 7:177
- Moreno AD, Ibarra D, Fernandez JL, Ballesteros M (2012) Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Bioresource Technol 106:101-109.
- Moreno AD, Ibarra D, Ballesteros, I, Fernández JL, Ballesteros M. (2013a) Ethanol from laccase detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces*-Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. Biochem Eng J 400 79:94-103.
- Moreno AD, Tomas-Pejo E, Ibarra D, Ballesteros M, Olsson L (2013b) In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. Bioresource Technol 143:337-343.
- Oliva-Taravilla A, Tomás-Pejó E, Demuez M, González-Fernández C, Ballesteros M (2015a) Inhibition of cellulose enzymatic hydrolysis by laccase-derived compounds from phenols. Biotechnol Prog 31:700-706.
- Oliva-Taravilla A, Moreno AD, Demuez M, Ibarra D, Tomás-Pejó E, González-Fernández C, Ballesteros M (2015b) Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. Bioresource Technol 175:209-215.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. Bioresource Technol 74:17-24.
- Pareek N, Gillgren T, Jönsson LJ (2013) Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. Bioresource Technol 148:70–77.

- Rico A, Rencoret J, Del Río JC, Martínez AT, Gutiérrez A (2014) Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. *Biotechnol Biofuels* 7:1.
- Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW (2010) Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J Agr Food Chem* 58:9043-9053.
- Sun X, Bai R, Zhang Y, Wang Q, Fan X, Yuan J, Cui L, Wang P (2013) Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. *Appl Biochem Biotech* 171:1673-1680.
- Sun XF, Xu F, Sun RC, Fowler P, Baird MS (2005) Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr Res* 340:97-106.
- Tomás-Pejó E, Alvira P, Ballesteros M, Negro MJ (2011) Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: Ashok Pandey, Christian Larroche, Steven C Ricke, Claude-Gilles Dussap, Edgard Gnansounou editors: Burlington: Biofuels, Academic Press, pp. 149-176.
- Wang FQ, Xie H, Chen W, Wang ET, Du FG, Song AD (2013) Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technol* 144:572-578.
- Witayakran S, Ragauskas AJ (2009) Modification of high-lignin softwood kraft pulp with laccase and amino acids. *Enzyme Microb Tech* 44:176-181.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Tech*, 48:54-60.

Artículo 4

Effect of laccase dosage on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded wheat straw

Alfredo Oliva-Taravilla, Elia Tomás-Pejó, Marie Demuez, Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros

Cellulose Chemistry and Technology

Accepted for publication

Abstract

When laccases are applied for detoxifying steam-exploded slurries, enzymatic hydrolysis is affected. In this study, 10% (w/v) DW of slurry or WIS fraction were subjected to 48 h enzymatic hydrolysis in the presence of different laccase loadings (0.1, 0.5, 5 or 10 IU/g DW). All laccase dosages higher than 0.1 IU/g DW significantly inhibited glucose recovery. Nevertheless, half amount of phenolic compounds present in steam-exploded slurries was removed with 0.1 IU/g DW of laccase, while 75% of phenolic compounds were efficiently eliminated when employing 0.5 IU/g DW laccase. These findings suggested that, in order to avoid enzymatic hydrolysis inhibition, laccase dosage has to be kept as low as possible for detoxifying steam-exploded wheat straw slurry.

Keywords: Lignocellulose, wheat straw, enzymatic hydrolysis, laccase detoxification, ATR-FTIR

1. Introduction

Phenols are well known inhibitors for cellulases activity and yeast viability in bioethanol production processes (Haven and Jorgensen, 2013; Moreno et al., 2013a; Ximenes et al., 2011; Oliva et al., 2006; Larsson et al., 2000). The presence of these inhibitory compounds in steam-explosion pretreated lignocellulosic materials, limits the direct use of whole steam-exploded slurries. In this context, the removal of phenolic compounds has been investigated, and the use of laccases enzymes has been proved as an interesting approach to detoxify steam-exploded wheat straw (Moreno et al., 2013a). Laccases act on phenolic substrates by catalyzing the oxidation of their hydroxyl groups to phenoxyl radicals while molecular oxygen (O_2) is reduced to water (Andreu and Vidal, 2013). Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw enhances the fermentability of slurries, reducing the lag phase of the fermentative microorganism and therefore, increasing ethanol production (Moreno et al., 2013b).

However, the application of laccases for detoxifying steam-exploded wheat straw reduces glucose release during the enzymatic hydrolysis step (Oliva-Taravilla et al., 2015a; Moilanen et al., 2011; Jurado et al., 2009). In a previous work, Oliva-Taravilla and co-workers (2015b) showed that phenoxyl radicals and phenolic oligomers formed by laccase oxidation, together with lignin modifications are involved in the inhibition of enzymatic hydrolysis. The utilization of laccases as detoxifying agents would allow the use higher substrates loadings or even the use of whole pretreated slurries, reducing the global ethanol production cost. Therefore, it is crucial to determine the optimal condition of laccase treatment to increase steam-exploded pretreated substrates fermentability without affecting enzymatic hydrolysis. In this sense, laccase dosage should be optimized regarding the saccharification rate and phenol removal.

In the present study, the effect of different dosages of *Myceliophthora thermophila* laccase (LMt) on enzymatic hydrolysis of whole slurry and water insoluble solid fraction (WIS) of steam-exploded wheat straw was evaluated. After that, the effect of the optimal laccase dosage for the enzymatic hydrolysis was evaluated in ethanol production in SSF process using *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 as fermentative microorganism.

2. Material and Methods

2.1. Raw material and pretreatment

Wheat straw was supplied by CEDER-CIEMAT (Soria, Spain). Two slurries were obtained after steam explosion pretreatment at 200 °C for 10 min or 7 min were directly used as substrate for enzymatic hydrolysis purposes or in SSF assays respectively. Part of the slurry obtained at 200 °C for 10 min was filtrated by vacuum-filtration in order to obtain: the solid fraction or WIS and the liquid fraction or prehydrolysate. Substrates were analyzed as described in the analytical methods.

2.2. Enzymes

The cellulolytic enzymes employed in this study were NS50013 (Celluclast 1.5L), containing 60 FPU/mL of total cellulase activity and NS50010 (Novo188) with 510 CBU/mL of β -glucosidase activity. Laccase from *M. thermophila* (LMt) showed 127 IU/mL activity using ABTS substrate. All these enzymes were kindly supplied by Novozymes (Denmark).

2.3. Enzymatic hydrolysis

10% (w/v) DW of slurry or WIS were diluted in 50 mM citrate buffer at pH 5 and were used as substrates for enzymatic hydrolysis. For all assays, cellulolytic enzymes, Celluclast 1.5L and Novo188, were loaded at 5 FPU/g DW and 5 CBU/g DW of substrate, respectively. All assays were run in triplicate in 100 mL-flasks at 50 °C and 180 rpm for 48 h.

2.4. Laccase treatment on enzymatic hydrolysis

The different laccase dosages were 0.1, 0.5, 5 and 10 IU/g DW of substrate. Laccase was added simultaneously to cellulolytic enzymes during enzymatic hydrolysis.

2.5. Microorganisms and media

The thermotolerant strain *K. marxianus* CECT 10875 was used as fermenting microorganism. For inoculation, active cultures were obtained in 250 mL flasks with 100 mL of growth medium containing 20 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 2 g/L NH_4Cl ,

1 g/L KH_2PO_4 , and 0.3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. After 16 h on a rotary shaker at 180 rpm at 42 °C, the cultures were centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Supernatant was discarded and cells were diluted to obtain the inoculum size of 1 g/L DW according to the SSF conditions. SSF assays were carried out on the above described media, replacing glucose by the pretreated wheat straw.

2.6. Simultaneous saccharification and fermentation

The slurries obtained after pretreatment were diluted to 10% (w/v) of totals solids in 50 mM citrate buffer at pH 5 under unsterile conditions.

As previously toxicity test, both slurries were supplemented with 10 IU/g DW of LMt simultaneously. The high laccase dosage was selected in this case in order to evaluate the influence of the other toxics on ethanol production by *K. marxianus* when almost all phenolic compounds were removed. Once the toxicity of slurries was evaluated, the slurry with less toxicity was subjected to SSF process. In this context, laccase was added simultaneously with hydrolytic enzymes at 0.1 IU/g DW substrate to the diluted slurry. All detoxification steps stood at 50 °C, 180 rpm for 6 h respectively before yeast addition. Thus, a presaccharification process in these assays was 6 h previous of the fermentation step.

Control and laccase treated assays were inoculated with 1 g/L DW of *K. marxianus* CECT 10875. SSF experiments were run at 42 °C for 72 h. Samples were withdrawn periodically for glucose and ethanol analysis.

2.7. Analysis by ATR-FTIR

Residual solids obtained after enzymatic hydrolysis were recovered by centrifugation and analyzed by ATR-FTIR using a Thermo Nicolet 6700 FT-IR spectrometer. Spectra were collected at room temperature in the 2000-800 cm^{-1} range with 1.9 cm^{-1} resolution and being an average of 32 scans. In order to make spectra clearer, each FTIR spectrum obtained from an assay without laccase was subtracted to the corresponding FTIR spectrum from a laccase-treated assay.

2.8. Analytical methods

The chemical composition of slurry and WIS fraction was analyzed using the National Renewable Energy Laboratory (NREL) standard methods for structural

carbohydrates and lignin in biomass (Sluiter et al., 2010). Glucose, xylose and ethanol concentration were quantified according to a previous work (Oliva-Taravilla et al., 2015a). Furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), acetic and formic acids in prehydrolysate were quantified according previously reported procedure (Tomás-Pejó et al., 2008). Total phenolic content in prehydrolysate and supernatants after enzymatic hydrolysis was analyzed according to a modified version of the Folin–Ciocalteu method (Oliva-Taravilla et al., 2015).

3. Results and discussion

3.1. Effect of laccase dosage on phenolic content

As WIS is the solid vacuum-filtered fraction of whole slurry, it possesses lower phenols content. Therefore, phenolic content was only analyzed using slurry as substrate. To evaluate the effect of the different laccase dosages on the removal of phenolic compounds, total phenolic content was measured after 4, 6 and 24 h enzymatic hydrolysis (Figure 1). For all laccase dosages, a significant phenols decrease was observed at 6 h. Longer incubations did not result in higher detoxification. This fact indicates that phenols removal by laccase was only effective at the early stages of enzymatic hydrolysis, which is in agreement with Jurado et al. (2009). The slight decrease of phenolic content in untreated-laccase control assay at 24 h could be attributed to phenolic oxidation by natural reaction with atmospheric oxygen (Vermerris et al., 2009).

Laccase treatment at the lowest enzyme dosage tested (0.1 IU/g DW) showed a reduction of 45% of total phenols at 6 h, whereas higher reduction of 76%, 79% and 85% was quantified using 0.5, 5 and 10 IU/g DW laccase, respectively (Figure 1). From these results, it can be concluded that low laccase dosage of 0.1 IU/g DW was able to remove half amount of phenolic compounds present in steam-exploded slurries, while 0.5 IU/g DW laccase was efficient enough to eliminate more than 75% of phenolic compounds. Slight improvement in phenols removal was obtained at higher laccases dose of 5 and 10 IU g/DW.

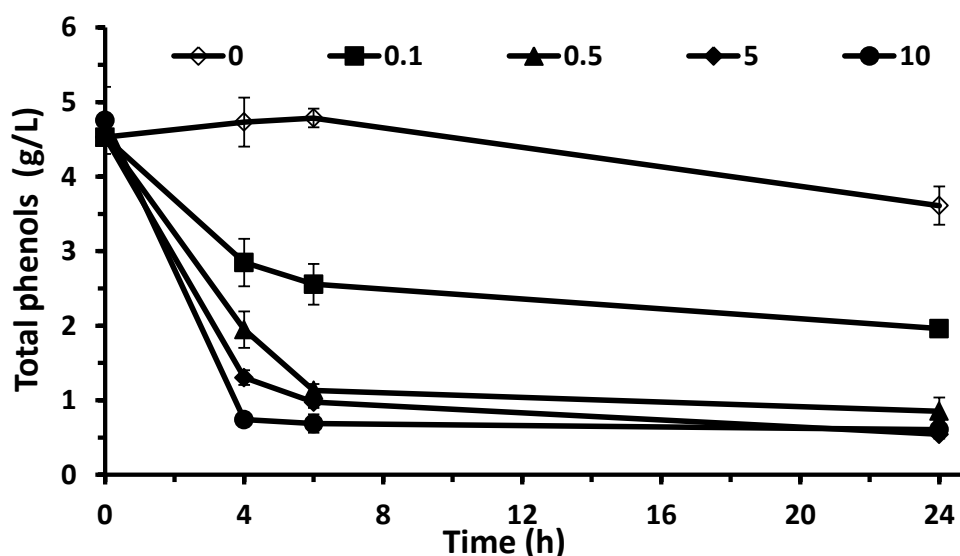


Figure 1. Time course of total phenols content during enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) DW slurry when treated or not with laccase; (0: not laccase-treated; 0.1: 0.1 IU/g DW laccase; 0.5: 0.5 IU/g DW laccase; 5: 5 IU/g DW laccase; 10: 10 IU/g DW laccase).

3.2. Effect of laccase loading on enzymatic hydrolysis

10% (w/v) DW of slurry or WIS fraction were subjected to 48 h enzymatic hydrolysis in presence of different laccase loadings (0, 0.1, 0.5, 5 or 10 IU/g DW). Figure 2 and 3 shows the glucose and xylose recovered at early (6 h) and late stages (48 h) of enzymatic hydrolysis of both substrates in presence of several laccase dosages. At 6 h of enzymatic hydrolysis of both substrates, sugar production (glucose and xylose) was not affected by laccase treatment at any dose tested. At late stage of enzymatic hydrolysis (48 h) xylose content was not affected by the presence of laccase at any dosage tested (Figure 2a and 2b). However, a significant decrease in glucose production was observed at 48 h. These results are in accordance with several previous studies (Oliva-Taravilla et al., 2015a; Qiu and Chen, 2012; Moilanen et al., 2011; Jurado et al., 2009). Oliva-Taravilla and co-workers (2015b) reported that xylanases components of the cellulolytic enzymatic cocktails (Celluclast 1.5L) were less susceptible to be inhibited by the action of laccase. The results presented in figure 2 shows that the inhibitory effect by laccase on glucose production by enzymatic hydrolysis was time-dependent.

Glucose production by enzymatic hydrolysis of both substrates was not affected significantly in experiments at the lowest laccase dosage of 0.1 IU/g DW. Nevertheless, significant lower glucose release was observed in assays with 0.5, 5 and 10 IU/g DW of

laccase (Figure 3a and 3b). At laccase dosage from 0.5 to 10 IU/g DW, same levels (in the range of 23%) of inhibition were measured for both substrates.

Laccase detoxification of 10% (w/v) DW slurry and WIS using 0.1 IU/g DW affected the glucose recovery of 4.4% and 7.9 %, respectively, compared to not laccase-treated assay (Figure 2a and 2b). Lignin content in the pretreated substrates plays a key role in the cellulose enzymatic hydrolysis inhibition by laccases (Oliva-Taravilla et al., 2015b). Lignin fraction present in WIS is higher (35.6%) than in slurry (18.53%), thus laccase oxidation of phenolic units forming lignin has a greater impact on WIS hydrolysis even at low laccase dosages, compared to slurry hydrolysis.

In the present study, maximum saccharification rate of steam exploded wheat straw treated with LMt was obtained with 0.1 IU/g DW of laccase, the minimal amount tested. From 0.5 IU/g DW laccase dosages, glucose release was significantly affected in both substrate cases. On the contrary, Qiu and coworkers (2012) obtained the maximum saccharification rate of steam exploded wheat straw treated with laccase from *Sclerotium* sp. using 0.55 U/g of laccase, while conversion rate decreased with further increase of laccase dosage. These results indicate that the efficient detoxification of pretreated lignocellulosic materials without affecting enzymatic hydrolysis is dependent on laccase dosage, which has to be optimized for any specific case.

3.3 Effect of laccase dosage on lignin structural changes

Residual solids obtained after enzymatic hydrolysis were analyzed by ATR-FTIR to evaluate the potential structural changes on lignin fiber generated by the different laccase dosages. With both substrates, the corresponding FTIR spectrum subtractions (Figure 4) did not show any difference in the 1160- 900 cm^{-1} region, attributed to vibration of carbohydrates. The main variable intensity was observed at 1512 cm^{-1} which is attributed to aromatic ring vibrations of lignin due to aromatic skeletal vibration (C=C) (Liu et al., 2014). As much as laccase dosage increases, the intensity of the band at 1512 cm^{-1} decreases. Laccase oxidation of phenolic subunits of lignin generates modifications at its surface and gives rise to higher hydrophobic interactions between lignin and cellulose.

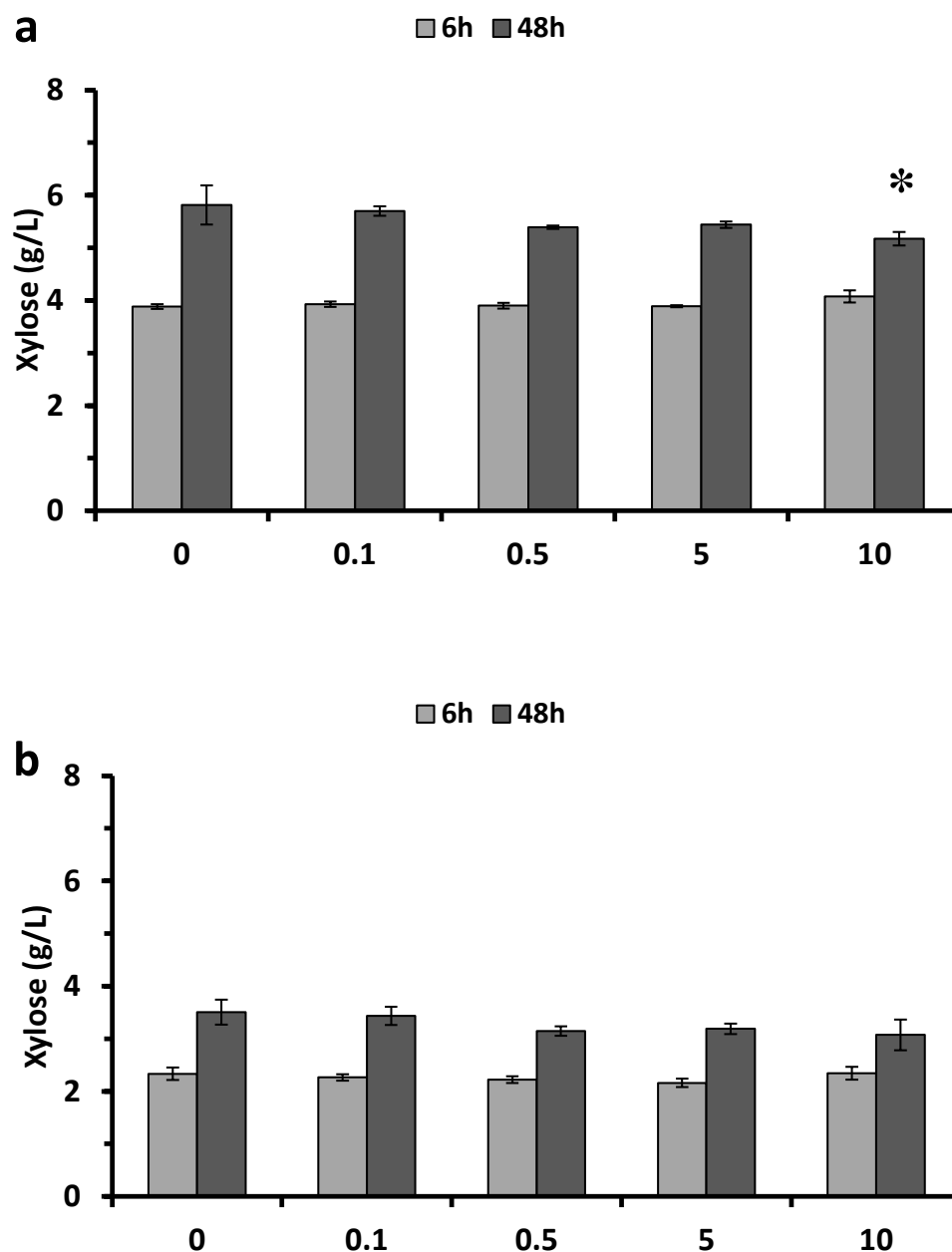


Figure 2. Xylose release at 6 h (clear bars) and 48 h (grey bars) in enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) slurry or WIS treated with 0, 0.1, 0.5, 5 or 10 IU/g DW of laccase (a: Xylose content on slurry; b: Xylose content on WIS; * significantly different from corresponding control without laccase (p-values < 0.05))

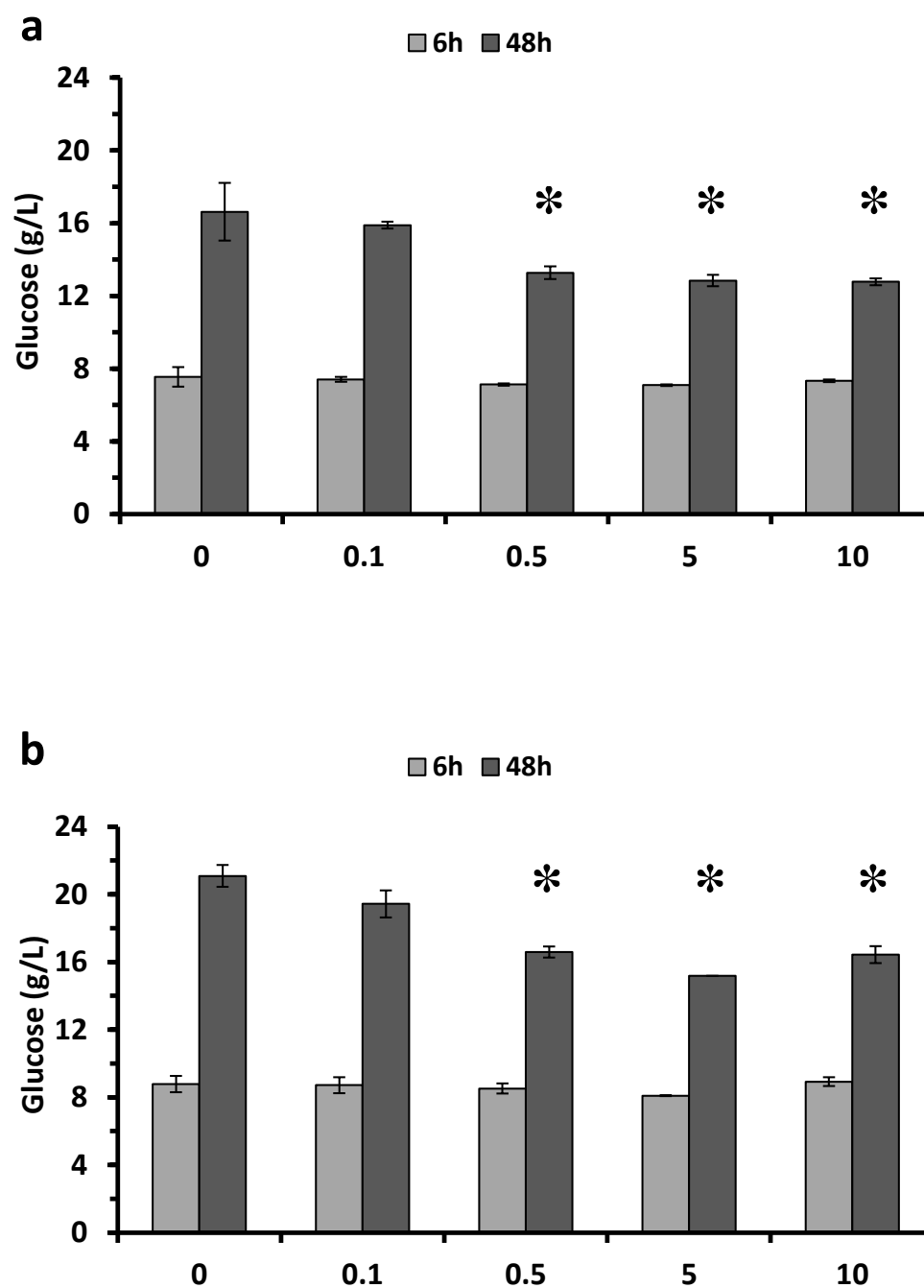


Figure 3. Glucose release at 6 h (clear bars) and 48 h (grey bars) in enzymatic hydrolysis of 10% (w/v) slurry or WIS treated with 0, 0.1, 0.5, 5 or 10 IU/g DW of laccase (a: Glucose content on slurry; b: Glucose content on WIS; * significantly different from corresponding control without laccase (p-values < 0.05))

3.4. Integration of laccase detoxification in the SSF process

The toxicity of two different slurries obtained after steam explosion pretreatment at 200 °C for 10 min or 7 min on ethanol production by *K. marxianus* CECT 10875 was evaluated. In this context, the highest laccase dosage tested in previous enzymatic hydrolysis assays was added simultaneously with cellulolytic enzymes, in order to remove most of the phenolic compounds from slurry and to evaluate the influence of the others inhibitory compounds on ethanol production by *K. marxianus*.

Although the addition of 10 IU/g DW laccase removed 85% of total phenols in both slurries diluted at 10% (p/v) of total solids, the ethanol production by *K. marxianus* using the slurry pretreated at 200 °C for 10 min and 7 min was 3 and 7.7 g/L of ethanol, respectively (Figure 5). The higher concentrations of the others toxics, such as weak acids, in the slurry pretreated at harsh conditions (200 °C, 10 min) could explain the lower ethanol concentration obtained after 72 h of SSF process. Indeed, the concentration of acetic and formic acids in the slurry pretreated for 10 min, was 13.3 and 9.5 g/L, respectively, which is 3 fold higher than in the slurry obtained after 7 min of steam explosion (Table 1). Steam explosion is an appropriated pretreatment to increase the accessibility of enzymes to cellulose by hemicellulose solubilization and lignin redistribution, however the harsher conditions applied also promote the release of weak acids (Alvira et al., 2010). It is known that high amount of weak acids could affect the yeast fermentation capacity (Mira et al., 2010). In this context, the optimization of pretreatment conditions that provides both, an adequate hydrolysis rate and does not promote the liberation of inhibitory compounds becomes crucial.

Table 1. Composition of wheat-straw prehydrolysates

Degradation products on prehydrolysate (g/L)	200 °C 10 min	200 °C 7 min
5-HMF	0.3	0.1
Furfural	0.4	1.0
Acetic acid	13.3	5.1
Formic acid	9.5	3.1
Total phenols	4.6	4.9

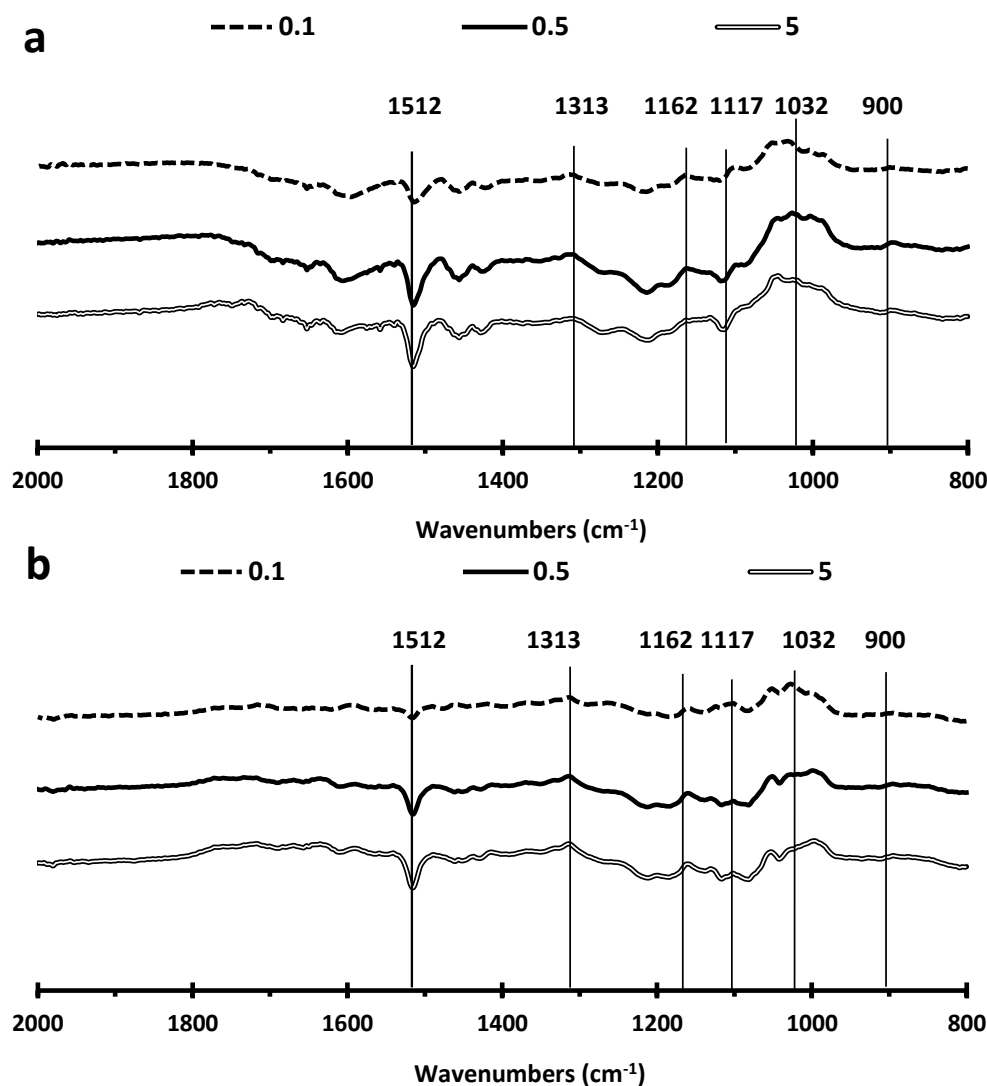


Figure 4. Subtractions of FTIR spectra obtained from the residues of enzymatic hydrolysis assays of slurry or WIS and resulting from the subtraction of sample treated with 0.1, 0.5 or 5 IU/g DW of laccase minus the corresponding control sample without laccase (a: slurry; b: WIS).

As the slurry obtained after 200 °C for 7 min showed less toxicity for *K. marxianus* CECT 10875, this substrate was used in further SSF process. In this case, laccase at 0.1 IU/g DW of substrate was added simultaneously with hydrolytic enzymes for 6 h at 50 °C to perform simultaneous hydrolysis and detoxification before fermentation. As Figure 6 shows, a slight improvement to ethanol production was observed when laccase was supplemented. This was due to that, using this substrate, the addition of 0.1 IU/g DW laccase allowed removing 58% of totals phenols. However, this was not enough to improve the fermentability of the slurry. Although the total phenolic content in both prehydrolysates was similar (Table 1), the higher phenol removal by laccase could due

to different pretreatment conditions that affect phenol composition directly and therefore, the mechanism of polymerization will be different (Canfora et al., 2008).

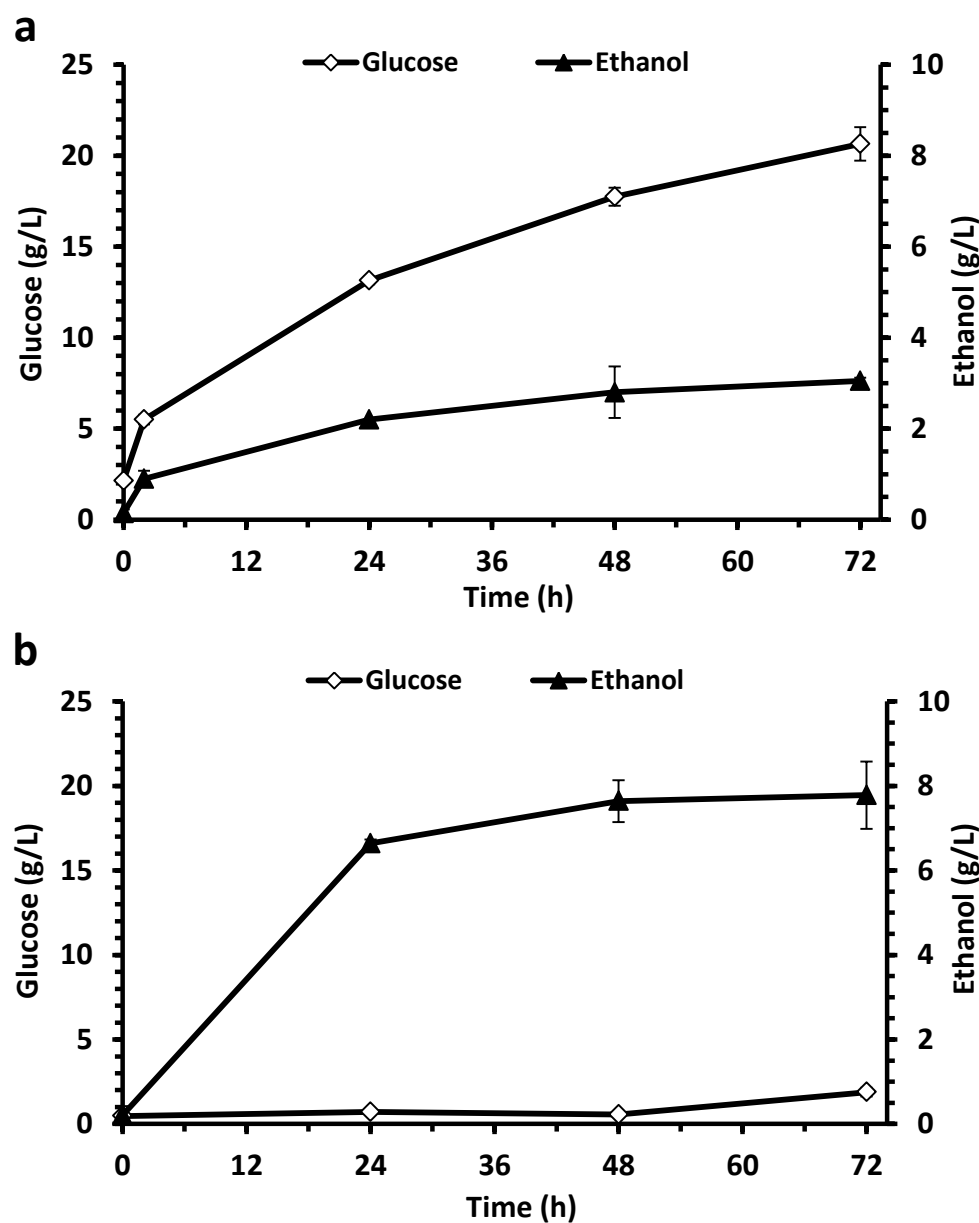


Figure 5. Time course for ethanol (filled triangles) and glucose (open diamonds) during simultaneous saccharification and fermentation (SSF) assays of slurry samples treated with laccase. (a) SSF assay with slurry obtained after steam explosion pretreatment at 200 °C 10 min. (b) SSF assay with slurry obtained after steam explosion pretreatment at 200 °C 7 min.

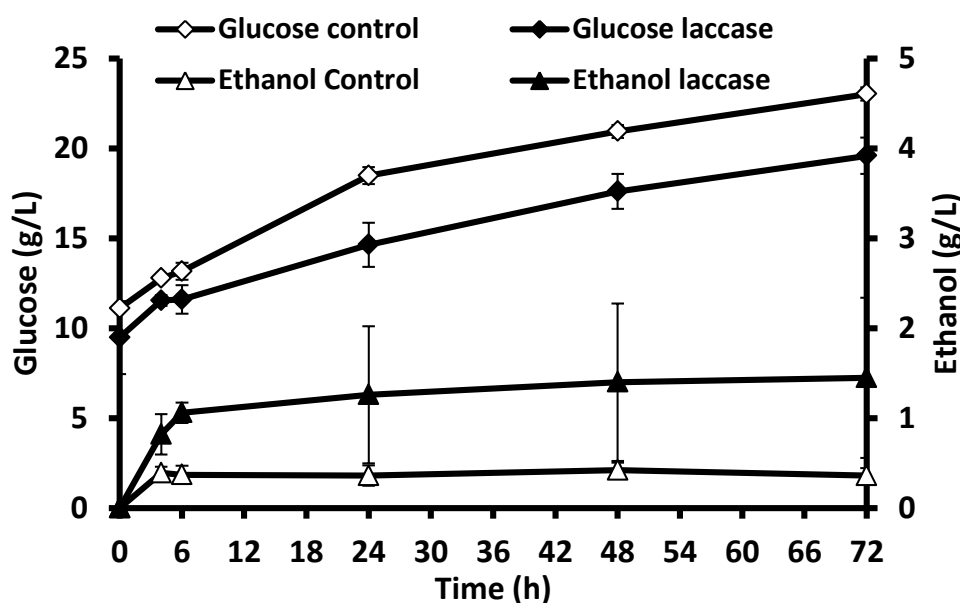


Figure 6. Time course for ethanol (triangles) and glucose (diamonds) during simultaneous saccharification and fermentation (SSF) assays of slurry samples in absence and presence of laccase. Symbols used: Open symbols control assays without laccase addition. Filled symbols laccase addition.

Conclusions

The effect of laccase dosage on enzymatic hydrolysis and on phenols removal was mainly time-dependent. The laccase dosage that avoided the inhibition of enzymatic hydrolysis from pretreated whole slurry of wheat straw was found to be 0.1 IU/g DW. Although this low laccase dosage seems to be the most suitable regarding enzymatic hydrolysis, the fermentability of half detoxified slurries was not improved. In this context, the optimization of laccase dosage in ethanol production processes become crucial to overcome the inhibitory effect on *K. marxianus* CECT 10875, allowing the use of whole slurries and the increase of substrate loadings, improving glucose yields and therefore, ethanol production.

Acknowledgments

Dr. Ignacio Ballesteros (CIEMAT) is greatly acknowledged for helping in the pretreatment and characterization of wheat straw. Dr. Elia Tomás-Pejó acknowledges the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n° 291803.

References

- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851-4861.
- Andreu, G., Vidal, T., 2013. Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* and phenolic compounds: Can the efficiency of an enzyme mediator for delignifying kenaf pulp be predicted? *Bioresour. Technol.* 131, 536-540.
- Canfora, L., Iamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase. *J. Agr. Food Chem.* 56, 1398-1407.
- Haven, M.O., Jorgensen, H., 2013. Adsorption of beta-glucosidases in two commercial preparations onto pretreated biomass and lignin. *Biotechnol. Biofuels* 6, 165.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100, 6378–6384.
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N., Jönsson, L.J. 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 617-632.
- Liu, Y., Hu, T., Wu, Z., Zeng, G., Huang, D., Shen, Y., He, X., Lai, M., He, Y. 2014. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 14004- 14013.
- Mira, N.P., Becker, J.D., Sá-Correia, I. 2010. Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid. *OMICS A J. Integr. Biol.* 14, 587-601.
- Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., Viikari, L., 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 492–498.
- Moreno, A.D., Tomás-Pejó, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., Olsson, L. 2013a. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. *Bioresour. Technol.* 143, 337-343.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M. 2013b. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresour. Technol.* 135, 239-245.
- Oliva, J.M., Negro, M.J., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., González, A., Ballesteros, M. 2006. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem.* 41, 1223-1228.

- Oliva-Taravilla, A., Moreno, A. D., Demuez, M., Ibarra, D., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M. 2015a. Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 175, 209-215.
- Oliva-Taravilla, A., Tomás-Pejó, E., Demuez, M., González-Fernández, C., Ballesteros, M. 2015b. Inhibition of cellulose enzymatic hydrolysis by laccase-derived compounds from phenols. *Biotechnol. Progr.* 31, 700-706.
- Qiu, W., Chen, H., 2012. Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. *Bioresour. Technol.* 118, 8-12.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W. 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J. Agric. Food. Chem.* 58, 9043-9053.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 874–884.
- Vermerris, W. and Nocholson, R. in “Phenolic compound biochemistry”, edited by Springer Science+Business Media B.V., 2009, pp. 48-49.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M. 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 54-60.

Artículo 5

Optimization of the laccase detoxification step in hybrid hydrolysis and fermentation processes from wheat-straw by *K. marxianus* CECT 10875

Alfredo Oliva-Taravilla, Elia Tomás-Pejó, Marie Demuez, Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros

Bioethanol

Accepted for publication

Abstract

The addition of laccase enzymes reduces the amount of phenols present in lignocellulosic pretreated materials and increases their fermentability. However, laccase addition in combination with cellulases reduces hydrolysis yields. In this work, hybrid hydrolysis and fermentation (HHF) configuration allowed overcoming the negative effect of laccase treatment on enzymatic hydrolysis. Furthermore, the effects of different laccase dosages, length of detoxification time and inoculum size on ethanol production were evaluated. In the evaluated configurations, the different laccase dosages did not show any significant effect on enzymatic hydrolysis. The lowest laccase dosage (0.5 IU/g DW) removed ~70% of total phenols which was enough to reach the highest ethanol production yields (~10 g/L) using *K. marxianus* CECT 10875. Shorter detoxification times and larger inoculum sizes had a positive impact on both ethanol production and volumetric productivity. These optimal detoxification conditions enable the fermentation of inhibitory slurries by reducing the overall time and cost of the process.

Keywords: Wheat straw; slurry; laccase detoxification; thermotolerant yeast; HHF process

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is a suitable candidate for bioethanol production due to its worldwide distribution, low cost and non-competition with food crops. However, the recalcitrant structure of lignocellulosic biomass hampers the release of sugars contained in both cellulose and hemicellulose polymers. To break down the tight organization of lignocellulose, a pretreatment step to disrupt the structure and increase the accessibility of cellulolytic enzymes is needed [1]. Steam explosion is one of the most extensively applied pretreatment methods for ethanol production from wheat straw [2,3]. However, the harsh conditions during steam explosion treatment lead to the formation of inhibitory compounds, such as furans, weak acids and phenolic compounds. These compounds are released to the liquid phase during pretreatment and can affect the enzymes and fermentative microorganism [4,5]. Because of that, the removal of the inhibitors before the fermentation step is beneficial to improve ethanol yields.

The use of oxidoreductases, such as laccases, is a good approach for specifically removing phenolic compounds [6,7]. Laccases are gaining interest as detoxification enzymes in the biofuel industry and their use is very promising to replace complex and costly physical and chemical detoxification methods. Phenols removal by laccase allows the use of whole slurries and high substrate loadings in ethanol production processes [8]. However, several studies proved that when laccases are supplemented to the enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw, lower glucose recoveries are attained [6,9]. Oliva-Taravilla et al. [10] showed that phenoxyl radicals, phenolic oligomers and modifications of the phenolic subunits of lignin all produced by laccase action, are involved in the inhibition of enzymatic hydrolysis. In this context, the efficient integration of the detoxification step by laccases is required to minimize the adverse effects on enzymatic hydrolysis.

In a bioconversion scheme to produce ethanol from lignocellulose, the enzymatic hydrolysis and fermentation steps can either be performed separately, in separate hydrolysis and fermentation (SHF) or simultaneously, in simultaneous saccharification and fermentation (SSF). In an SSF the enzymatic hydrolysis and fermentation are performed at the same time in one single step. SSF processes, however, are usually conducted at lower temperatures than the optimum for cellulolytic enzymes that is around 50°C [11]. Additionally, a third option combining

presaccharification with subsequent SSF is referred as hybrid hydrolysis and fermentation (HHF). This last configuration has been shown to be particularly advantageous [12]. Optimum temperature is an important factor to take into account when considering SHF, SSF or HHF. In SHF configuration, enzymatic hydrolysis and fermentation are performed at their respective optimum temperatures. However, the main drawback of SHF is the end-product inhibition produced by glucose and cellobiose which reduces the rate and yields of enzymatic hydrolysis.

Since most of the fermenting yeasts have an optimum temperature ranging from 30 to 38°C, the use of thermotolerant yeasts in SSF processes would imply higher enzymatic hydrolysis yields [3,13]. *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, capable of growing and fermenting at temperatures above 42°C, has been successfully used in SSF processes from wheat straw with high yields [14]. It is worth to mention that high temperatures increase yeast susceptibility to inhibitory compounds due to changes in cell membrane [14]. This fact makes the use of thermotolerant yeasts on slurries very challenging. In this sense, the use laccases as detoxification enzymes is even more important to increase slurries fermentability when employing thermotolerant yeasts. In this study, the effect of the laccase dosage, the duration of the detoxification step and the inoculum size was evaluated in terms of ethanol production, yields and productivities achieved by *K. marxianus* in HHF processes.

2. Materials and methods

2.1. Raw material and pretreatment

Wheat straw was supplied by CEDER-CIEMAT (Soria, Spain). Autocatalyzed steam explosion of wheat straw was performed at 200°C and 7 min in a steam explosion pilot plant. These conditions were optimized in a previous work [15]. After pretreatment, the slurry was recovered and vacuum filtered in order to obtain: (i) the Water Insoluble Solid fraction or WIS and (ii) the liquid fraction or prehydrolysate. Both fractions were analyzed as described in the analytical methods.

2.2. Enzymes

Celluclast 1.5L (NS50013) and Novozym 188 (NS50010) containing 60 FPU/mL of cellulase activity and 510 CBU/mL of β -glucosidase activity, respectively,

were used as cellulolytic enzymes. For presaccharification and subsequent HHF, 15 FPU/g dry weight (DW) substrate of Celluclast 1.5L and 15 CBU/g DW of Novo188 were added. Laccase from *Myceliophthora thermophila* (NS51003) with 127 IU/mL was used as detoxification catalyst. All these enzymatic cocktails were kindly provided by Novozymes A/S (Denmark).

2.3. Microorganisms and media

The thermotolerant *K. marxianus* CECT 10875 strain [16] was used as fermenting microorganism. For inoculation, active cultures were obtained in 250 mL flasks with 100 mL of growth medium containing 20 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 2 g/L NH₄Cl, 1 g/L KH₂PO₄, and 0.3 g/L MgSO₄ · 7H₂O. After 16 h on a rotary shaker at 180 rpm at 42°C, the cultures were centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Supernatant was discarded and cells were diluted to obtain the desired inoculum size according to the HHF conditions. HHF assays were carried out on the above described media, replacing glucose by the pretreated wheat straw.

2.4. Hybrid hydrolysis and fermentation

The slurry obtained after pretreatment was diluted to 10% (w/v) of totals solids in 50 mM citrate buffer at pH 5 under unsterile conditions.

In HHF assays presaccharification step was conducted at 50°C and 180 rpm. In HHF experiments without laccase (control) the presaccharification step lasted 20 h. In case of assays with detoxified slurries, laccase were applied after 12 h presaccharification, Laccase was added at 0.5, 2.75 or 5 IU/g DW substrate to the diluted slurry according to the process configuration and experimental design (Table 1). Detoxification step stood at 50 °C, 180 rpm for 4, 8, or 12 h before yeast addition. Thus, the whole presaccharification process in these assays was 16, 20 or 24 h long depending on the duration of the detoxification step.

Control assays were inoculated with 1 or 3 g/L DW of *K. marxianus* CECT 10875. Laccase treated assays were inoculated with 1, 2 or 3 g/L DW of *K. marxianus* according to the factorial design (Table 1). HHF experiments were run at 42°C for 72 h. Samples were withdrawn periodically for glucose and ethanol analysis.

2.5. Analytical methods

The chemical composition of the WIS fraction was analyzed using the National Renewable Energy Laboratory (NREL) standard methods for determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP-002, LAP-003, and LAP-019) [17]. Total phenolic content of the supernatants was determined according to a modified version of the Folin–Ciocalteu method [2].

Furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) content in the prehydrolysate was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Hewlett Packard, Palo Alto, CA USA), using an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA USA) at 55 °C. As mobile phase, 89% 5 mM H₂SO₄ and 11% acetonitrile at a flow rate of 0.7 mL/min was used. For detection, a 1040A Photodiode Array Detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was employed. Acetic and formic acids were quantified by HPLC with a 410 Waters Refractive Index Detector (HPLC-RID) (Waters Corporation, Milford, MA USA). The Aminex HPX-87H column was maintained at 65 °C with a flow rate of 0.6 mL/min mobile phase (5 mM H₂SO₄). Glucose and ethanol concentration from HHF were quantified by HPLC-RID employing the Aminex HPX-87H column at 50 °C and 5 mM H₂SO₄ as a mobile-phase (0.5 mL/min) for separation.

2.6. Experimental design

The effect of the laccase detoxification time (4, 8 and 12 h), laccase dosage (0.5, 2.75 and 5 IU/g DW of substrate), and inoculum size (1, 2 and 3 g/L DW) on ethanol production, ethanol yield and ethanol productivity was evaluated using statistical analysis standardized Pareto charts. The response surface plots were constructed later with the regression model. To determine the number of experiments, a factorial design at two levels with one central point was carried out using the Software Statgraphics Plus 5.0. The effects of the 3 parameters were statistically analyzed in nine assays including one central point (Table 1).

Analysis of variance (ANOVA) followed by the multiple range test at 95% confidence level (Statgraphics Plus 5.0) was applied to evaluate the statistical significance of laccase dosages, duration of detoxification step and inoculum size.

Table 1. Composition of steam-exploded wheat straw at 19.7% (w/v) totals solids

Composition of WIS	% (w/w) DW
Cellulose	55.1
Hemicellulose	7.3
Lignin	32.6
Ash	3.8
Composition of prehydrolysate (g/L)	
Total sugars*	
Glucose	4.8
Xylose	27.0
Galactose	2.5
Arabinose	1.9
Degradation products	
5-HMF	0.1
Furfural	1.0
Acetic acid	5.2
Formic acid	3.1
Total phenols	4.9

*Total sugars determined after acid hydrolysis

3. Results and discussion

3.1. Steam explosion pretreatment

Table 2 shows chemical composition of the WIS fraction and prehydrolysate of steam-exploded wheat straw. After steam explosion pretreatment, slurry with a total solids content of 19.7% (w/v) was obtained wherein WIS accounted for 11.3% (w/v). WIS fraction is composed mainly of cellulose and lignin. In the prehydrolysate, 27 g/L xylose (mainly in oligomeric form) was obtained due to the extensive solubilization of hemicellulosic sugars. Acetic acid (5.2 g/L), formic acid (3.1 g/L), and phenolic compounds (4.9 g/L) were found to be the main degradation products. Acetic acid is formed primarily by hydrolysis of acetyl groups of hemicellulose, while formic acid arises as degradation products from polysaccharides. Formic acid is a product of furfural and 5-HMF degradation. The content of aliphatic acids in slurries varies strongly upon the type of feedstock and the severity of the pretreatment. Feedstocks with high content of acetylated xylan, typically agricultural residues and hardwood, result in higher concentrations of aliphatic acids than softwood. Furfural (1 g/L) and 5-HMF (0.1 g/L), coming from sugar degradation, were also present in lower

concentration. These results are in accordance to previous works that shown similar inhibitors composition and content in steam-exploded wheat straw prehydrolysates [2,18].

Table 2. Coded and actual levels of variables chosen for the statistical design of experiment. Factorial design at two levels with 1 central point to study the effect of laccase dosage, detoxification time and inoculum size.

Assay	Laccase dosage (IU/g DW)	Detoxification time (h)	Inoculum size (g/L DW)
1	0.5	4	1
2			3
3	5	4	1
4			3
5	0.5	12	1
6			3
7	5	12	1
8			3
9	2.75	8	2

Among all the degradation products released during steam explosion pretreatment, phenolic compounds are the most potent inhibitors [8,9,19,20]. More specifically, phenolic compounds have been reported to inhibit or deactivate the cellulolytic enzymes [19]. Phenol concentrations depend on the biomass type, the pretreatment conditions and the biomass to water ratio. Although the level of inhibition is highly dependent on the type and concentration of phenol, these compounds are potent cellulase inhibitors even at low concentrations [10,19-21]. Concentrations of phenolic compounds of 1.3 g/L were reported to strongly inhibit cellulases during the hydrolysis of microcrystalline cellulosic substrate [21]. Similarly, García-Aparicio et al. [22] found 50% cellulase inhibition in presence of prehydrolysate from steam-exploded barley straw with 4.9 g/L total phenols.

Phenols do not only affect enzymatic hydrolysis but also the fermentation process [8,23]. In many cases, the mechanism of toxicity that could be related to specific functional groups of phenols has not been elucidated [24]. Concentration of aromatic phenols, such as vanillin, in the range of 0.9-1.2 g/L caused oxidative stress and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae* [25]. Although this range of concentrations did not inhibit the growth of *S. cerevisiae* [26], the combination of different degradation products, inhibited the growth of *K. marxianus* [4].

Phenolic compounds act cumulatively. In this sense, their elimination or reduction is needed to increase enzyme and yeast performance. In this study, to optimize laccase detoxification step, slurry was diluted at 10% (w/v) of totals solids which implied a reduction of phenolic concentration by half (2.5 g/L).

3.2. Ethanol production in HHF process with non-detoxified slurries

To test the fermentability of steam-exploded wheat straw without any detoxification step, preliminary HHF experiments were carried out without laccases. In absence of laccase, no glucose consumption nor ethanol production were observed independently of the inoculum size (1 and 3 g/L) after 72 h of HHF (data not shown). These results confirmed the high toxicity of slurries obtained at 200°C for 7 min (even when diluted at 10% (w/v) total solids) for *K. marxianus* CECT 10875. These results were in agreement with Moreno et al. [27] and confirmed that under these conditions, cell growth and ethanol production were completely inhibited.

3.3. Integration of laccase detoxification in the HHF process

Since laccase treatment results in significant inhibition of enzymatic hydrolysis yield [10], it seems crucial to separate enzymatic hydrolysis and laccase treatment. In this sense, a configuration consisting in a presaccharification step followed by laccase detoxification at 50°C and then the HHF process at 42°C was evaluated in terms of different ethanol production parameters (ethanol production, yield and productivity).

3.3.1. Presaccharification and laccase detoxification step

Operational conditions given by the statistical experimental design are shown in Table 1. After 12 h of presaccharification, laccase at different dosages was added, and detoxification was performed for 4, 8 or 12 h. Total phenols were measured before and after the presaccharification and detoxification step (Figure 1). Pretreated slurry at 10% (w/v) totals solids contained 2.5 g/L of total phenols. After 20 h of presaccharification, the concentration of phenols increased to 4 g/L (Control, Figure 1). This result showed that phenols were released during enzymatic hydrolysis. In commercial enzymatic cocktails such as Novo188, several types of enzymes are present. This cocktail is a cellulase preparation from *Aspergillus niger* containing mainly β -glucosidase activity.

However, Novo188 cocktail has been shown to comprise also xylanases and feruloyl esterase activities [28]. The feruloyl esterase enzymes could be responsible for the phenols increase due to phenol release from hemicellulose and lignin [29]. As a consequence, higher content of phenols are usually recovered after enzymatic hydrolysis, making the substrate even more toxic for the fermentation step [2,14].

The detoxification step using 0.5 UI/g DW of laccase resulted in ~70% phenols removal regardless of the incubation time (Figure 1). At the highest laccase dosages (2.75 and 5 IU/g DW), ~80% phenols removal was obtained. Extending the detoxification time did not increase phenols removal. The latter only depended on laccase dosage. Previous works showed a similar reduction of total phenols close to 80% in presence of higher laccase of 10 IU/g DW of substrate, even though initial phenol concentration was lower (2.5 g/L versus 4 g/L) [4]. Herein, the saturation of phenol removal was achieved from 2.75 IU/g DW laccase dosage. This result indicated that laccase detoxification reached the highest level that may not be increased due to the recalcitrant nature of the 20% phenols left or to laccase saturation/deactivation over the time. The latter is consistent with the fact that laccase action does not improve with longer detoxification times. Indeed, Kunamneni et al. [30] observed that free *M. thermophila* laccase lost nearly 20% of residual activity at pH 5 after 12 h of incubation.

In terms of glucose released, after 12 h of presaccharification, all the assays contained approximately 15 g/L glucose, which corresponds to 40% of hydrolysis efficiency. After 20 h presaccharification, the glucose reached 23 ± 0.5 g/L in the control assay without laccase treatment. On the other hand, in the assays treated with laccase, the glucose concentration was around 20 g/L after 16 and 24 h of presaccharification plus detoxification and 22.9 ± 1.5 g/L glucose after 20 h of presaccharification plus detoxification (Table 3). Therefore, addition of laccase after 12 h of presaccharification did not result in a significant hydrolysis inhibition. These results indicated that this configuration, namely 12 h of presaccharification and 4 or 8 h of detoxification is a promising strategy that avoids a significant enzymatic hydrolysis inhibition.

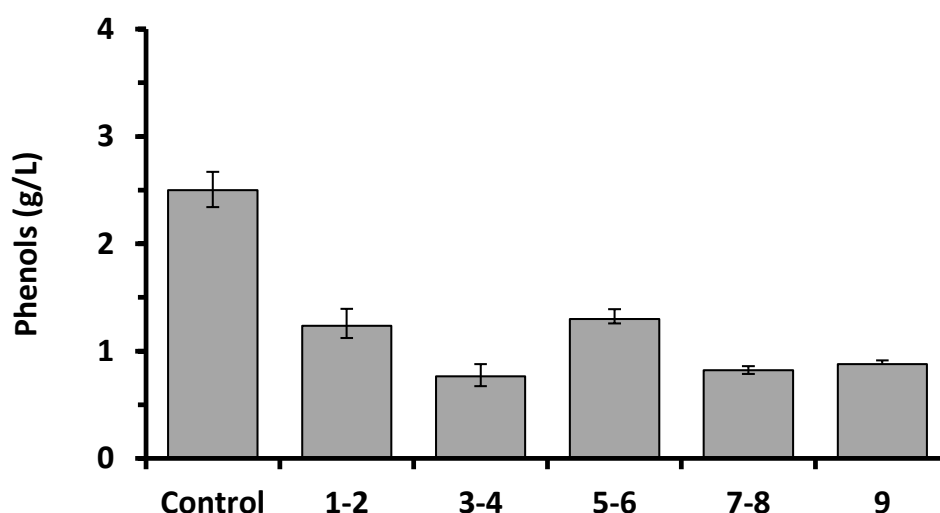


Figure 1. Total phenols content after presaccharification plus detoxification step. Control: no laccase addition.

3.3.2. Effects on ethanol production in HHF

After the presaccharification plus detoxification step, the temperature was reduced to 42°C (optimal temperature for *K. marxianus* CECT10875 fermentation). Then, yeast inoculum was added at 1, 2 or 3 g/L DW according to the factorial design (Table 1). According to the Pareto chart (Figure 2a), the addition of different laccase dosages (0.5, 2.75 or 5 IU/g DW) did not have a significant effect on ethanol production, whereas the detoxification time had a statistically significant negative impact. Although 0.5 IU/g DW resulted in the lowest phenol removal (1-2; Figure 1), 4 h of detoxification time was enough to avoid the inhibitory effect on yeast fermentation, leading to higher ethanol concentrations (10.2 ± 0.8 and 10.8 ± 0.8 g/L) compared with higher laccase dosage or longer detoxification time (Table 3). This result highlighted the importance of optimizing the laccase dosage and operating conditions in order to improve ethanol yields without increasing the cost of the process.

In the case of inoculum size, a statistically significant positive effect on maximum ethanol concentration was observed (Figure 2a and b). Indeed, assays at low laccase dosage with a detoxification time of 12 h and 3 g/L DW of inoculum showed the same levels of ethanol concentration at 24 h of HHF than the assays with 4 h of detoxification and 1 or 3 g/L DW of inoculum (Table 3). This proved the positive impact of inoculum size on ethanol production which can relieve the negative effect of

prolonged detoxification periods. The negative effect of the detoxification length on ethanol production could be due to the release of acetyl groups from hemicelluloses and phenols from lignin during the presaccharification [2,31]. In this context, prolonged laccase treatment also implied longer hydrolysis times that contributed to increase the presence of other inhibitors in the media.

Table 3. Glucose (Glu) produced after presaccharification step plus detoxification step at 16, 20 or 24 h. Data values of SSF assays: EtOH, Ethanol concentration at 24 h; Q_{e6h} and Q_{e24h} , volumetric ethanol productivity at 6 and 24 h. ND: not detected. NF: not fermented.

Assay	Glu (g/L)	EtOH (g/L)	Q_{e6h} (g/L h)	Q_{e24h} (g/L h)
1	19.3 ± 0.8	10.2 ± 0.3	0.6	0.4
2		10.8 ± 0.8	1.3	0.4
3	20.1 ± 0.5	10.1 ± 1.0	0.7	0.4
4		10.2 ± 0.5	1.5	0.4
5	21.3 ± 1.2	ND	ND	ND
6		10.0 ± 0.9	1.4	0.4
7	20.6 ± 0.4	ND	ND	ND
8		9.6 ± 1.1	1.4	0.4
9	22.9 ± 1.5	10.0 ± 1.4	0.9	0.4
Control	23.6 ± 0.5	NF	NF	NF

3.3.3. Effect on volumetric productivities of ethanol in HHF

According to Figure 3a, only the inoculum size had a statistically significant positive effect on volumetric productivity at 6 h of HHF process (Q_{e6h}). At 24 h of HHF process, in addition to the positive effect of the inoculum size, a statistically significant negative impact due to the detoxification time was observed on volumetric productivity (Q_{e24h}) (Figure 3b). Higher inoculum size implied faster glucose consumption and higher ethanol production rates. Thus, even though the ethanol productivity was lower, the ethanol concentration was around 10 g/L in almost all cases.

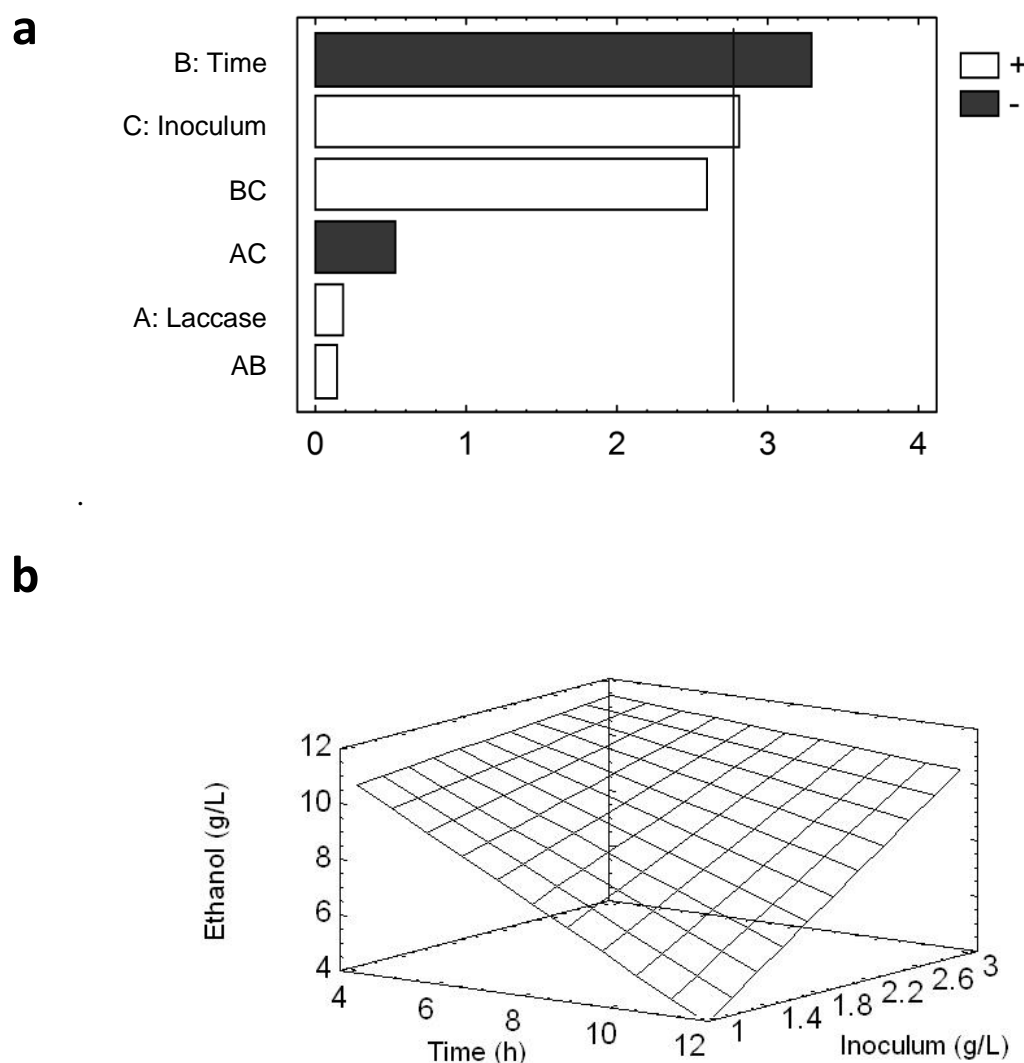


Figure 2. Standardized Pareto chart (a) and Surface response plots (b) of the effect of laccase dosage fixed at 0.5 UI/g DW, detoxification time and inoculum size on ethanol concentration at 24 h of HHF process.

During presaccharification and subsequent detoxification, acetic acid could be released from residual acetyl groups of hemicelluloses by cellulolytic enzymes. In this work, acetic acid was measured before and after presaccharification and after laccase treatment. After 12 h of presaccharification, a slight increase in acetic acid concentration (8.8%) was observed in all assays. This increment was even more obvious after laccase treatment. An increase of 23.8% and 27.2% acetic acid concentration was measured after 16 h and 24 h of presaccharification plus detoxification, respectively. Despite the removal of 70-80% of totals phenols, this elevated concentration of acetic acid could affect the yeast fermentation capacity. Rugthaworn et al. [32] determined that ~1.8 g/L of acetic acid was the half maximal inhibition concentration (IC₅₀) of the growth of *K. marxianus* strain TISTR5925 at 42°C. In our work, the initial acetic acid

concentration in the slurry was 2.5 g/L demonstrating that *K. marxianus* CECT 10875 was more resistant to acetic acid than others *K. marxianus* strains. It is known that robustness of yeast strain is favored when the size of the inoculum is maximized [33,34]. In this context, the development of robust inocula becomes crucial in ethanol production processes. The optimization of the propagation strategy or the development of recombinant strains that overexpress important genes which confer toxic and stress resistance have been proved to be efficient strategies for overcoming the low bioethanol yields attained when slurries are used as substrate [33,35].

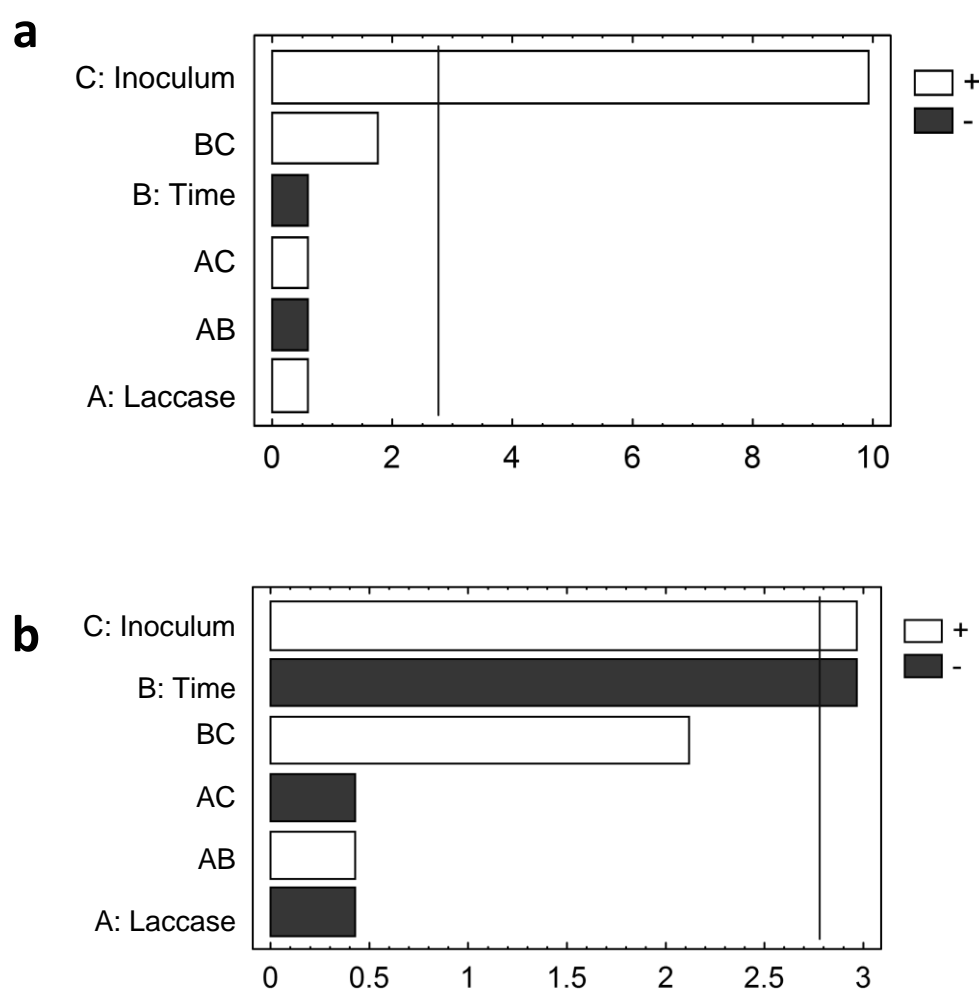


Figure 3. Standardized Pareto chart of the effect of laccase dosage, detoxification time and inoculum size on ethanol volumetric productivity at 6 h (Q_{e6h}) (a) and 24 h (Q_{e24h}) (b) of HHF process.

Conclusions

Laccase treatment decreased the inhibitory profile of slurries by reducing total phenolic content. Optimized detoxification conditions allowed overcoming the

inhibitory effect of the laccase treatment on the enzymatic hydrolysis. However, prolonged detoxification times caused lower ethanol concentration and productivity than short ones when low inoculum sizes were applied. This fact reveals the high influence of other toxics on the yeast and thus, the use of robust and tolerant yeast strains becomes necessary. The HHF process configuration assayed in this work improved the ethanol volumetric productivities by adding the lowest laccase dosage.

Acknowledgments

Drs. Ignacio Ballesteros and Jose Miguel Oliva (CIEMAT) are greatly acknowledged for helping in the pretreatment, characterization of wheat straw and the design of experiments. This study is partially supported by The Spanish Ministry of Science and Innovation (LIGNOYEAST, ENE2014-315 54912-R) and The Community of Madrid (RESTOENE2, P2013/MAE-2882 project). Elia Tomás-Pejó acknowledges the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n° 291803.

References

1. Galbe M., Zacchi G., Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials, *Biomass Bioenerg.*, 2012, 46,70-78
2. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour. Technol.*, 2010, 101,4851-4861
3. Camargo D., Gomes S.D., Sene L., Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2014, 37,2235-2242
4. Oliva J.M., Negro M.J., Sáez F., Ballesteros I., Manzanares P., González A., Ballesteros M., Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*, *Process Biochem.*, 2006, 41,1223-1228
5. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification, *Bioresour. Technol.*, 2000, 74,17-24
6. Moreno A.D., Ibarra D., Ballesteros I., González A., Ballesteros M., Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase, *Bioresour. Technol.*, 2013a, 135,239-245

7. Yu Y., Feng Y., Xu C., Liu J., Li D., Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production, *Bioresour. Technol.*, 2011, 102,5123-5128
8. Moreno A.D., Tomás-Pejó E., Ibarra D., Ballesteros M., Olsson L., In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies, *Bioresour. Technol.*, 2013b, 143,337-343
9. Oliva-Taravilla A., Moreno A.D., Demuez M., Ibarra D., Tomás-Pejó E., González-Fernández C., Ballesteros M., Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw, *Bioresour. Technol.*, 2015a, 175,209-215
10. Oliva-Taravilla A., Tomás-Pejó E., Demuez M., González-Fernández C., Ballesteros M., Inhibition of cellulose enzymatic hydrolysis by laccase-derived compounds from phenols, *Biotechnol. Progr.*, 2015b, 31,700-706
11. Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H., Novel enzymes for the degradation of cellulose, *Biotechnol. Biofuels*, 2012, 5
12. Varga E., Klinke H., Réczey K., Thomsen A., High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 88,567-574
13. Shanmugam S., Balasubramaniyan B., Jayaraman J., Ramanujam P.K., Gurunathan B., Simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from softwood *Moringa oleifera* using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388, *Int. J. ChemTech. Res.*, 2014, 6,5118-5124
14. Tomás-Pejó E., Oliva J.M., González A., Ballesteros I., Ballesteros M., Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process, *Fuel*, 2009, 88,2142-2147
15. Ballesteros I., Negro M.J., Oliva J.M., Cabañas A., Manzanares P., Ballesteros M., Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 130,496-508
16. Ballesteros I., Ballesteros M., Cabañas A., Carrasco J., Martín C., Negro M.J., Sáez F., Sáez R., Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1991, 28, 307-315
17. Sluiter J.B., Ruiz R.O., Scarlata C.J., Sluiter A.D., Templeton D.W., Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58,9043-9053
18. Tomás-Pejó E., Alvira P., Ballesteros M., Negro M.J., Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion, in: *Biofuels*, 2011, 149-176
19. Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M., Deactivation of cellulases by phenols, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, 48,54-60

20. Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M., Inhibition of cellulases by phenols, *Enzyme Microb. Technol.*, 2010, 48,170-176
21. Kim Y., Ximenes E., Mosier N.S., Ladisch M.R., Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, 48,408-415
22. García-Aparicio M.P., Ballesteros I., González A., Oliva J.M., Ballesteros M., Negro M.J., Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Pretreatment of Barley Straw on Enzymatic Hydrolysis, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 129,278-288
23. Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N., Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, *Biotechnol. Biofuels*, 2013, 6,16
24. Larsson S., Quintana-Sáinz A., Reimann A., Nilvebrant N., Jönsson L.J., Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000, 84,617-632
25. Nguyen T.T.M., Iwaki A., Ohya Y., Izawa S., Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2014, 117,33-38
26. Klinker H.B., Olsson L., Thomsen A.B., Ahring B.K., Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: Wet oxidation and fermentation by yeast, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 81,738-747
27. Moreno A.D., Ibarra D., Ballesteros I., Fernández J.L., Ballesteros M., Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces*-Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings, *Biochem. Eng. J.*, 2013c 79,94-103
28. Dien B.S., Ximenes E.A., O'Bryan P.J., Moniruzzaman M., Li X.L., Balan V., Dale B., Cotta M.A., Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol, *Bioresour. Technol.*, 2008, 99,5216-5225
29. García-Conesa M.T., Kroon P.A., Ralph J., Mellon F.A., Colquhoun I.J., Saulnier L.,Thibault J.F., Williamson G., A cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids, *Eur. J. Biochem.*, 1999, 266,644-652
30. Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M., Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, *Process. Biochem.*, 2008, 43,169-178
31. Juhasz T., Szengyel Z., Reczey K., Siika-Aho M., Viikari L., Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources, *Process. Biochem.*, 2005, 40,3519-3525
32. Rugthaworn R., Murata Y., Machida M., Apiwatanapiwat W., Hirooka A., Thanapase W., Dangiarean H., Ushiwaka S., Morimitsu K., Kosugi A., Arai T., Vaithanomsat P., Growth

inhibition of thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus*, in hydrolysates from cassava pulp, Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, 173,1197–1208

33. Tomás-Pejó E., Olsson L., Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates, Microb. Biotechnol., 2015, 8,999-1005

34. Zhao X., Moates G.K., Elliston A., Wilson D.R., Coleman M.J., Waldron K.W., Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre, Bioresour. Technol., 2015, 194,263-269

Hasunuma T., Sanda T., Yamada R., Yoshimura K., Ishii J., Kondo A., Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Microb. Cell. Fact., 2011, 10

4. *Discusión*

El bioetanol producido a partir de materiales lignocelulósicos constituye una de las alternativas más atractivas para disminuir la dependencia y consumo de combustibles fósiles en el sector de la automoción. Sin embargo, la estructura compleja y recalcitrante de la lignocelulosa dificulta el aprovechamiento de los carbohidratos, siendo imprescindible someter al material lignocelulósico a una etapa de pretratamiento que desestructure el material y contribuya a aumentar el área superficial y la porosidad de la fibra lignocelulósica. El pretratamiento por explosión por vapor ha demostrado ser un método eficaz para pretratar residuos agrícolas herbáceos como el rastrojo de maíz o la paja de trigo (Tomás-Pejó y col., 2009). Las severas condiciones de temperatura a las que se ve sometido el material durante el pretratamiento, no sólo provocan la desorganización de la estructura de la lignocelulosa, sino que también se generan compuestos inhibitorios derivados de la degradación parcial de los azúcares y la solubilización tanto de la lignina como de los grupos acetilos de las hemicelulosas (Alvira y col., 2010). Estos compuestos afectan negativamente a la hidrólisis enzimática de la celulosa y a la fermentación, por lo que reducen el rendimiento de producción en etanol (Moreno y col., 2012a). De entre los compuestos tóxicos presentes en los prehidrolizados (fracción soluble obtenida tras el pretratamiento) de paja de trigo, los compuestos fenólicos son los que tienen mayor potencial inhibitorio, ya que desactivan a las enzimas hidrolíticas e inhiben al microorganismo fermentador (Michelin y col., 2016, Oliva y col., 2006). Por lo tanto, una de las áreas de investigación más interesantes para aumentar los rendimientos del proceso de obtención de etanol de lignocelulosa es el estudio de los mecanismos involucrados en esta inhibición, así como el desarrollo de procesos que eliminen o reduzcan la cantidad de estos compuestos inhibidores. La biodestoxificación enzimática *in situ* utilizando lacasas permite la reducción del contenido de compuestos fenólicos en los prehidrolizados de paja de trigo obtenidos tras un pretratamiento de explosión por vapor. La menor concentración de compuestos fenólicos se traduce en una reducción de la etapa de adaptación de la levadura al material pretratado alcanzándose mayores rendimientos de etanol (Moreno y col., 2012a, 2013b). Sin embargo, a pesar de este efecto positivo sobre la fermentación cuando se aplica el tratamiento con lacasas sobre paja de trigo pretratada por explosión por vapor se han observado reducciones en el rendimiento de hidrólisis enzimática (Moreno y col., 2012a, Jurado y col., 2009). Los posibles mecanismos propuestos para explicar este efecto inhibitorio de las lacasas sobre la hidrólisis enzimática son:

(1) La oxidación de las unidades fenólicas de la lignina catalizada por la lacasa modificaría la estructura de la lignina. Estas modificaciones incrementarían la absorción no específica sobre la lignina de las enzimas hidrolíticas aumentando el número de uniones inespecíficas que conduciría a la reducción de la hidrólisis enzimática (Moilanen y col., 2011). (2) El tratamiento con lacasa estaría fortaleciendo las uniones lignina-carbohidrato dificultando la accesibilidad de las celulasas (Moilanen y col., 2011). (3) Los compuestos formados como consecuencia de la reacción de polimerización oxidativa de los compuestos fenólicos catalizada por la lacasa inhibirían las enzimas hidrolíticas (Tejirian y Xu, 2011, Jurado y col., 2009). Aunque todos estos mecanismos son aceptados para explicar la inhibición que ejercen las lacasas sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa, todavía no existen evidencias claras de si realmente hay un único mecanismo de inhibición o varios que actúan conjuntamente, y qué proceso es realmente el preponderante frente a los otros en la inhibición de la hidrólisis enzimática.

Esta Tesis doctoral, estudia los efectos de las lacasas sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa con el objetivo de determinar cada uno de los mecanismos inhibitorios propuestos. Para ello, se utilizaron dos lacasas fúngicas provenientes de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Myceliophthora thermophila*, y se estudió su efecto sobre la hidrólisis enzimática de la celulosa en términos de glucosa recuperada. Como sustrato se emplearon sustratos celulósicos modelo (Sigmacell) y material lignocelulósico (paja de trigo) pretratado por explosión por vapor. Una vez estudiado el efecto sobre la hidrólisis enzimática de la presencia de lacasas y discutidos los posibles mecanismos de inhibición, se estudió la integración del tratamiento de destoxificación *in situ* con lacasas dentro del proceso global de producción de etanol lignocelulósico. Se evaluó la dosis de lacasa mínima requerida para la destoxificación de los medios obtenidos tras el pretratamiento de la paja de trigo pretratada que permita una fermentación eficiente sin afectar a la hidrólisis enzimática. Se optimizó el tiempo de destoxificación y la carga de inóculo en la fermentación para obtener los mejores rendimientos globales del proceso de producción de etanol utilizando una configuración de proceso de Hidrólisis y Fermentación Híbrida (HFH).

4.1. Elucidando los efectos del tratamiento con lacasa en la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada.

Los tres principales mecanismos propuestos involucrados en la inhibición de la hidrólisis enzimática por lacasa, implican la presencia en los medios de la hidrólisis enzimática de los compuestos diana para la lacasa: lignina y fenoles.

Sin embargo, también podría existir una inhibición directa de las lacasas sobre las enzimas celulolíticas. En este contexto, se evaluó el efecto directo de la lacasa de *P. cinnabarinus* (LPc) sobre la hidrólisis enzimática de un compuesto celulósico modelo de alta pureza (Sigmacell). Las hidrólisis enzimáticas se realizaron utilizando dos concentraciones de sustrato [5% y 10% peso/volumen (p/v)] en tampón citrato 50 mM, pH 5, utilizando enzimas comerciales a 15 UPF/g PS de sustrato del cóctel Celluclast 1.5L y 15 UI/g PS de sustrato de Novo 188. La adición de 10 UI/g PS de sustrato de LPc durante la hidrólisis enzimática de 5% de Sigmacell no tuvo un efecto significativo sobre la recuperación de glucosa relativa (RGR) (Artículo 1, Figura 1). En cambio, cuando se incrementó la carga de sustrato al 10% (p/v), la misma dosis de lacasa produjo un descenso estadísticamente significativo de casi 10 puntos porcentuales ($P < 0,01$) en la recuperación de glucosa libre. Este descenso no puede atribuirse a la acción catalítica de las lacasas ya que el sustrato era celulosa pura y no había en los medios de hidrólisis ni lignina ni fenoles sobre los que puedan actuar las lacasas. La menor recuperación de glucosa observada en los ensayos a mayor carga de sustrato puede atribuirse a cambios en los mecanismos de interacción y adsorción de las celulasas en presencia de lacasas. En estos experimentos, la dosis de celulasas y lacasas era función de la carga de sustrato. Por lo tanto, en el ensayo al 10% (p/v) el contenido total de proteína era el doble que en el ensayo al 5% (p/v) y, puesto que las lacasas también tienen capacidad de adsorberse sobre la fibra de celulosa, pueden competir con las celulasas por los sitios de unión. Este aumento en el contenido total de proteína podría explicar la diferencia en RGR observada entre los dos ensayos.

Para comprobar si un aumento en la dosis de lacasa provocaría esta competencia por los sitios de unión de las celulasas a la celulosa, se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática con 10% (p/v) de Sigmacell en presencia de 1, 5, 10 y 15 UI de lacasa/g de sustrato. Aunque la concentración proteína total no aumentó significativamente tras la adición de la lacasa, la relación lacasa/enzimas hidrolíticas (L/H), se incrementó de 0,14% a 2,06%, siendo suficiente para reducir la RGR en 5 puntos porcentuales

(Artículo 1, Tabla 2). El análisis de regresión del efecto de las distintas dosis de lacasa sobre la RGR, mostró una correlación tanto lineal como cuadrática (Artículo 1, Figura 2). Aunque ambas ecuaciones fueron estadísticamente significativas ($P_{\text{lineal}} < 0,01$; $P_{\text{cuadrática}} < 0,05$), el modelo cuadrático mostró un mejor coeficiente de correlación ($R^2 = 0,999$).

Estos resultados son coincidentes con los observados por otros autores. Qiu y Chen (2012) observaron un incremento en el rendimiento de hidrólisis de paja de trigo pretratada por explosión por vapor en presencia de 0,55 IU de lacasa/g de sustrato. Sin embargo, un aumento en la dosis de lacasa provocó un descenso en el rendimiento de conversión de celulosa en glucosa. Estos resultados, mostraron una correlación entre la dosis de lacasa y el rendimiento de hidrólisis enzimática. A medida que se incrementaba la dosis de lacasa se observaba un efecto negativo en la RGR, sugiriendo la existencia de una competencia por los sitios de unión a la celulosa entre las celulasas y las lacasas. La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la participación secuencial de varias enzimas. Durante las primeras fases de hidrólisis las endoglucanasas y celobiohidrolasas actúan sobre el polímero insoluble de celulosa produciendo oligómeros solubles de bajo peso molecular. Posteriormente, las β -glucosidasas actúan sobre los productos de hidrólisis de las endoglucanasas y celobiohidrolasas. La producción de glucosa a las 24 h (Artículo 1, Figura 1b) en los ensayos de hidrólisis enzimática de 10% (p/v) de Sigmacell en presencia de 10 UI de lacasa/g sustrato fue significativamente menor ($P < 0,01$), a la obtenida en el ensayo sin lacasa. Este resultado sugiere que no todas las actividades celulolíticas se ven afectadas de la misma manera por la presencia de la lacasa. Por ello, se evaluó el efecto directo de la lacasa sobre las enzimas hidrolíticas en ausencia de celulosa. Para ello, se incubaron las enzimas hidrolíticas (Celluclast 1.5L y Novozyme 188) en presencia de 0,5, 1 y 2 UI/mL de LPc. Tras la incubación se determinaron las actividades celulasa (FPasa) y β -glucosidasa usando papel de filtro y celobiosa como sustratos, respectivamente (Artículo 1, Tabla 1). En el caso de la actividad FPasa, el análisis de la varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas en ninguna de las dosis empleadas de lacasa. Por el contrario, la actividad β -glucosidasa fue 7 puntos porcentuales menor ($P < 0,001$) en presencia de 2 UI/mL de lacasa. Estos resultados sugieren que la actividad β -glucosidasa se ve mucho más afectada que la actividad celulasa en presencia de lacasa. Además del posible efecto de competencia entre las celulasas y lacasas a los sitios de unión ya explicado

anteriormente, el descenso observado en la tasa de hidrólisis a las 24 h, podría deberse también a la inhibición que la lacasa ejerce sobre la actividad β -glucosidasa.

Una vez estudiado el efecto de la presencia de lacasas sobre la hidrólisis enzimática de una celulosa altamente purificada, se estudió su efecto sobre la producción de glucosa en un sustrato que contenía lignina como es la paja de trigo pretratada por explosión por vapor. Este pretratamiento provoca la solubilización de las hemicelulosas, lo que aumenta la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático, y una solubilización parcial de la lignina. Esta lignina, se reorganiza durante el proceso de enfriamiento, depositándose en forma de “gotas” sobre la superficie de la fibra de celulosa (Alvira y col., 2010). La presencia de lignina, dificulta la hidrólisis enzimática de la celulosa, entre otros factores, por el aumento de las uniones improductivas de las celulasas a la fibra de lignina (Pareek y col., 2013). Con el objetivo de disminuir la cantidad de lignina de los materiales pretratados, y disminuir el efecto de las uniones improductivas de las celulasas, en algunos estudios se han empleado las lacasas como método de deslignificación enzimática (Moreno, Tesis Doctoral, 2013). Este autor observó que, tras 72 h de hidrólisis enzimática el tratamiento con LPc provocó una disminución en la RGR respecto a las muestras sin lacasa. Cabe destacar que también observó que el tratamiento con lacasas producía un ligero aumento en el contenido en lignina de los sustratos pretratados. Este aumento fue atribuido al hecho de que las lacasas provocan la repolimerización de los compuestos fenólicos solubles presentes en los medios de hidrólisis que precipitan y que quedan embebidos en el material pretratado. Este aumento en el porcentaje de lignina de la paja de trigo pretratada, refuerza la hipótesis de que el aumento de las uniones improductivas de las celulasas sea el responsable de la disminución del rendimiento de hidrólisis enzimática. A mayor cantidad de lignina existe mayor probabilidad de que las celulasas se queden unidas de forma inespecífica a la misma, disminuyendo así la actividad celulolítica.

En este sentido, cualquier mecanismo que conduzca a la reducción de estas interacciones inespecíficas supondría una mayor cantidad de celulasas productivas y por tanto, mayor rendimiento de hidrólisis. La presencia de surfactantes no iónicos como el Berol, Tween 80 o polietilenglicol (PEG) en los medios de hidrólisis, reduce la adsorción no específica de las celulasas a la lignina (Kristensen y col., 2007; Cannella y Jørgensen, 2014). En este contexto, el residuo sólido insoluble (RSI) obtenido por filtración del MPC de paja de trigo pretratada por explosión por vapor, se sometió a hidrólisis enzimática en presencia o ausencia de PEG y LPc. En estos experimentos se

empleó únicamente el RSI con el fin de eliminar de los medios de hidrólisis la fracción de fenoles solubles presentes en la fracción líquida. En ausencia de LPc, la adición de 5% de PEG (p/p), incrementó en 1.4 veces la RGR en comparación con el ensayo sin PEG (Artículo 1, Figura 3a). Sin embargo, en los ensayos con LPc la adición de PEG no produjo mejoras significativas en la RGR (Artículo 1, Figura 3b). Este resultado sugiere que cuando se utiliza únicamente la fracción insoluble del material pretratado la adición de lacasa no conduce al aumento de las uniones no específicas de las celulasas a la lignina, ya que la presencia de PEG debería reducir las uniones no específicas de las celulasas de la misma forma que en el ensayo con PEG sin lacasa y por tanto, mejorar la RGR.

Las lacasas, además de oxidar los compuestos fenólicos solubles, pueden interaccionar con las unidades fenólicas del polímero de lignina. En este contexto, las lacasas pueden alterar la hidrofobicidad de la fibra de lignina lo que podría aumentar las interacciones lignina-carbohidrato y en consecuencia reducir los sitios de unión de las celulasas a la celulosa (Palonen y Viikari, 2004; Moilanen y col., 2011). Debido a las diferencias en la composición de la lignina de los materiales lignocelulósicos, los resultados aportados por los diferentes autores son contradictorios. El tratamiento con lacasa mejoró la tasa de hidrólisis enzimática de maderas blandas pretratadas por explosión por vapor (Moilanen y col., 2011). Por otro lado, Palonen y Viikari (2004) observaron que el tratamiento con lacasa producía un aumento de los grupos carboxilo en la lignina de píceas pretratadas por explosión por vapor. Este aumento de grupos carboxilo provocó un aumento en la superficie de la lignina de cargas negativas, lo que causó una disminución en su hidrofobicidad. Por el contrario, Moilanen y col. (2011), observaron un incremento en la adsorción no específica de las celulasas, resultando en menores recuperaciones de glucosa cuando se aplicaba el tratamiento con lacasas en caña común (*Arundo donax*) pretratada por explosión por vapor. De la misma manera, Jurado y col. (2009); Moreno y col. (2012), observaron menores recuperaciones de glucosa al tratar con lacasa paja de trigo pretratada por explosión por vapor.

En este contexto, aunque algunos autores han sugerido que el aumento de las uniones improductivas por parte de las celulasas a la lignina sería la causa de las menores recuperaciones de glucosa, en la presente Tesis, se ha comprobado que la adición de PEG durante la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada no revertió el efecto negativo del tratamiento con lacasa. Por tanto, se sugiere que el incremento de las uniones improductivas no parece ser la principal causa de las menores RGR tras el

tratamiento con lacasa y que son otros los mecanismos que provocan la inhibición de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Puesto que el mecanismo de reacción de las lacasas implica la polimerización oxidativa de los compuestos fenólicos a través de la formación de radicales inestables, podrían ser estos polímeros los que ejerzan un efecto inhibitorio sobre las enzimas hidrolíticas (Tejirian y Xu, 2011). Por otro lado, estos radicales pueden interaccionar con las fibras de lignina del material pretratado, mediante el proceso conocido como “grafting” (Aracri y col., 2010; Barneto y col., 2012). Cabe mencionar, que el RSI del material pretratado, obtenido tras la filtración del MPC, no fue lavado y contenía una notable cantidad de compuestos fenólicos libres embebidos entre las fibras del material y, por lo tanto, el tratamiento con lacasa podría reincorporar alguno de estos fenoles a las fibras de lignina.

Con el objetivo de elucidar estos posibles mecanismos, se analizó la composición del RSI tratado con LPC, observándose un ligero aumento en el porcentaje de lignina Klason (2-3%). Este resultado sugiere que algunos compuestos fenólicos se estarían reincorporando en la fibra de lignina. Aracri y col. (2011) describieron que el mecanismo de reincorporación de fenoles libres a la fibra de lignina es altamente dependiente de la estructura del fenol. Entre ellos, los ácidos *p*-hidroxicinámicos, tales como el ácido *p*-cumárico (AC) y el ácido ferúlico (AF), pueden reaccionar con la fibra de lignina uniéndose covalentemente a ella tras el tratamiento con lacasa. La paja de trigo contiene unos porcentajes de AF y AC que alcanzan el 5% de forma individual (Buranov y Mazza, 2008), parte de los cuales se solubilizan durante el pretratamiento (Moreno y col., 2012). En este sentido, el tratamiento con lacasa podría estar incorporando estos compuestos a la fibra de lignina, aumentando el contenido en lignina Klason y por tanto limitando el acceso de las celulasas a la celulosa. Para corroborar el mecanismo de reincorporación de estos ácidos *p*-hidroxicinámicos a la fibra de lignina por el tratamiento con lacasa, se analizó el residuo sólido remanente (RSR) tras la hidrólisis enzimática del RSI, tanto en ausencia como en presencia de lacasa, por espectroscopía infrarroja de reflexión atenuada (ATR-FTIR). Aunque los espectros de los RSR tratados y sin tratar con lacasa eran muy similares, se observó una reducción en la banda 1512 cm^{-1} (Capítulo 1, Material suplementario), atribuida generalmente a vibraciones del anillo aromático de las unidades fenólicas (Sun y col., 2005b; Ibarra y col., 2004). Las variaciones en la intensidad de banda son indicativas de la acción de la lacasa sobre las unidades fenólicas de la lignina, lo que provocaría cambios en la superficie de la lignina (Mattinen y col., 2005; Kahar, 2013). Por otro lado, se observó

un ligero incremento en la banda 1160 cm^{-1} . Esta banda puede ser atribuida a las vibraciones de los carbohidratos o a la vibración anti-simétrica del enlace C-O, indicando, probablemente, la formación de un enlace éster entre los ácidos ρ -hidroxicinámicos y la fibra lignocelulósica (Sun y col., 2002). Estos resultados, junto al incremento en el porcentaje de lignina Klason, apoyan la hipótesis de que el tratamiento con lacasas produce un efecto “grafting” donde los ácidos ρ -hidroxicinámicos se estarían reincorporando a las fibras de lignina del RSI. En concordancia con estos resultados Rencoret y col. (2014), observaron la incorporación de AF tras el tratamiento con lacasa a las fibras de lignina de pulpa de sisal (*Agave sisalana*). Por otro lado, además de los cambios en las intensidades de banda a 1512 y 1160 cm^{-1} , el espectro de infrarrojo del RSR tratado con lacasa mostró mayores intensidades de banda en la región atribuida a carbohidratos ($1035\text{-}1109\text{ cm}^{-1}$). Moilanen y col. (2011) observaron una mayor cantidad de glucano residual tras la hidrólisis enzimática de caña común tratada con lacasa. Teniendo en cuenta el proceso de “grafting” la formación de nuevos enlaces debida a la reincorporación de los ácidos ρ -hidroxicinámicos, podrían limitar la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a la celulosa, probablemente reduciendo el número o tamaño de los poros dificultando el avance de las celulasas.

En conjunto, estos resultados demuestran que la inhibición de la hidrólisis enzimática en presencia de lacasas implica numerosos mecanismos. En primer lugar, en la hidrólisis enzimática de sustrato celulósico modelo, se observó un aumento en la competencia por los sitios de unión a la celulosa entre celulasas y lacasas y una inhibición de la actividad β -glucosidasa. Sin embargo, este mecanismo es prácticamente indetectable cuando se emplea el RSI de la paja de trigo pretratada formada principalmente por celulosa y lignina, donde otros mecanismos tendrían un mayor efecto sobre la hidrólisis enzimática. El aumento en las uniones improductivas de las celulasas a la fibra de lignina no parece ser el mecanismo responsable de la menor tasa de hidrólisis enzimática. Sin embargo, los cambios en la estructura de la lignina y la reincorporación de algunos compuestos fenólicos a la fibra de lignina por la acción de la lacasa, parecen ser los mecanismos que limitan la accesibilidad de las enzimas celulolíticas a la celulosa.

4.2. Efecto de los productos de reacción generados por la lacasa sobre la hidrólisis enzimática

Los resultados obtenidos en la presente Tesis demuestran que la repolimerización de algunos compuestos fenólicos a la fibra de lignina tras el tratamiento con lacasa podría estar limitando la accesibilidad de las celulasas y por tanto, ser la causa de las menores recuperaciones de glucosa (Artículo 1). No obstante, como se ha mencionado, el mecanismo de acción de las lacasas implica la polimerización oxidativa de los compuestos fenólicos mediante la formación de radicales fenoxilo inestables (Ghoul y Chebil, 2012). En este contexto, el mecanismo de repolimerización es altamente dependiente de la estructura del fenol. Este hecho determina que unos radicales sean más estables que otros y bien polimericen entre ellos originando polímeros de fenoles o, reaccionen y se reincorporen a polímeros como la lignina (Aracri y col., 2010). Aunque la repolimerización de los ácidos *p*-hidroxicinámicos a la fibra de lignina tras el tratamiento con lacasas pueda ser una de las causas de las menores recuperaciones de glucosa, el papel tanto de los radicales fenoxilo como de los polímeros de fenoles sobre la hidrólisis enzimática no queda claro. Por lo tanto, el siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral fue el corroborar el papel de los productos derivados de la oxidación de los fenoles.

Con este objetivo, se evaluó el efecto del tratamiento de la lacasa de *M. thermophila* (LMt) en términos de glucosa liberada sometiendo al sustrato celulósico Sigmacell a hidrólisis enzimática en presencia de fenoles simples. Se escogieron como compuestos fenólicos, la vainillina (V), el siringaldehído (SA) y el ácido ferúlico (AF), debido a que son compuestos que se encuentran a menudo a concentraciones considerablemente altas en los prehidrolizados de paja de trigo pretratada por explosión por vapor. En primer lugar, se evaluó el efecto de estos compuestos fenólicos por separado en la hidrólisis enzimática en ausencia de lacasa. Tras 72 h de hidrólisis no se observó ninguna reducción en la glucosa recuperada comparada con el ensayo control sin lacasa, obteniéndose entre 62-65 g/L en todos los casos (Artículo 2, Figura 1a). Aunque algunos estudios han demostrado que los fenoles simples se pueden comportar como inhibidores para las celulasas (Ximenes y col., 2010; Kim y col., 2011), las concentraciones a las que causan dicha inhibición son realmente muy elevadas en comparación con las que se pueden encontrar en los prehidrolizados de paja de trigo.

En segundo lugar, se evaluó el efecto de estos compuestos fenólicos en presencia de lacasa. Interesantemente, la presencia de LMt en ausencia de fenoles no causó un descenso en la recuperación de glucosa al contrario de lo que se observó en el ensayo de hidrólisis enzimática de Sigmacell con la lacasa de *P. cinnabarinus* (LPc) (Artículo 1, Figura 1b). Este resultado indica que el efecto inhibitorio ejercido directamente por la lacasa sobre la hidrólisis enzimática es dependiente del tipo de lacasa. La combinación de LMt con V o SA, provocó una disminución en la glucosa recuperada del 42,6% y 32,6% respectivamente, en cambio la combinación de LMt y AF no produjo disminución en la concentración de glucosa. Como la presencia únicamente de lacasa en el medio no afectó a la hidrólisis y los compuestos fenólicos por sí solos no mostraron ningún descenso en la glucosa recuperada las menores recuperaciones de glucosa en presencia de ambos se deben probablemente a los productos derivados de la oxidación de los fenoles por parte de la lacasa. Además, a partir de estos resultados se puede concluir que el nivel de inhibición es dependiente del tipo de fenol y más concretamente de su estructura. En este contexto, la presencia de un grupo carbonilo en el carbono 1 del anillo aromático de V y SA (Artículo 2, Figura 3), podría estar participando en la estabilidad y reactividad de sus respectivos radicales fenoxilo (Andreu y col., 2013) haciéndolos más propensos a reaccionar con las enzimas celulolíticas.

Debido a que en los prehidrolizados de paja de trigo están presentes diferentes compuestos fenólicos, se evaluó el efecto sobre la hidrólisis enzimática de los compuestos fenólicos V, SA y AF bajo distintas combinaciones. En este contexto, V, SA y AF se añadieron simultáneamente (V+SA+AF) o en parejas (V+SA, V+AF, SA+AF) (Artículo 2, Tabla 3). En los ensayos en los que V estuvo presente se produjo un descenso de aproximadamente un 44% en la glucosa final en comparación con el ensayo control. Sin embargo, la combinación de SA+AF no produjo ningún efecto adverso en la hidrólisis enzimática. Estos resultados indican que el nivel de inhibición de la hidrólisis enzimática por la acción de los productos de reacción originados por la lacasa no es únicamente dependiente del tipo de fenol sino que es también altamente dependiente de la presencia varios fenoles en el medio. En concordancia con estos resultados Canfora y col. (2008) observaron que la presencia de determinados compuestos fenólicos condicionaba la eliminación mediante lacasas de algunos fenoles presentes en aguas residuales. Estos autores concluyeron que el mecanismo de polimerización de los radicales fenoxilo dependía altamente de la estructura, concentración y de la combinación de estos compuestos fenólicos. Atendiendo a la

estructura de los fenoles, los diferentes sustituyentes presentes en el anillo fenólico así como su distinta posición en éste, determinan tanto la estabilidad del radical fenoxilo como el mecanismo de polimerización (Sun y col., 2013). La formación del radical fenoxilo, supone la pérdida de un electrón del enlace hidroxilo en posición *para*- del anillo aromático. En este contexto, se ha observado que la energía del mayor orbital molecular ocupado (E_{HOMO} , del inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) influye directamente en el potencial de ionización de la molécula fenólica. Tanaka y col. (2010) observaron que cuanto más alta era esta energía con mayor facilidad se producía la oxidación del fenol. En este sentido, cuanto más similar sea la E_{HOMO} de dos compuestos fenólicos mayor facilidad de reaccionar y polimerizar entre ellos. Barneto y col. (2012), midieron la E_{HOMO} de varios fenoles simples. Estos autores observaron que SA poseía una E_{HOMO} similar al AF debido a la presencia de dos grupos metoxilo en su anillo fenólico, mientras que V presentaba una E_{HOMO} mucho menor al poseer un solo grupo metoxilo. En este contexto, debido a su E_{HOMO} similar, en la combinación de SA+AF ambos fenoles tenderían a reaccionar y polimerizar entre ellos en lugar de con las enzimas hidrolíticas.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto la participación de los radicales fenoxilo en la inhibición de la hidrólisis enzimática, no obstante, el tratamiento con lacasas también podría provocar que estos radicales fenoxilo polimerizaran entre sí originando fenoles poliméricos de alto peso molecular (Ghoul y Chebil, 2012). Estos compuestos poliméricos pueden interaccionar con las enzimas hidrolíticas, causando menores rendimientos de hidrólisis (Tejirian y Xu, 2011). En este contexto, para elucidar si realmente la inhibición observada en los ensayos anteriores era causada por la interacción directa de los radicales con las enzimas o por los compuestos poliméricos, se sometió al Sigmacell a hidrólisis enzimática en presencia de V, lacasa y PEG. Como se ha comentado en el artículo 1, el PEG es un aditivo capaz de reducir las uniones inespecíficas de las celulasas con polímeros fenólicos (Tejirian y Xu, 2011). En este sentido, para elucidar los productos causantes de la inhibición, el PEG fue añadido al principio o tras 30 h de hidrólisis enzimática. Independientemente del tiempo de adición, el PEG no consiguió mitigar el efecto inhibitorio (Artículo 2, Figura 4). Al ser la V el único fenol presente en el medio, las uniones entre los compuestos poliméricos y las enzimas no podrían ser la causa de la hidrólisis enzimática, ya que tras 30 h de hidrólisis enzimática todos los radicales fenoxilo habrían polimerizado y, la adición de

PEG por tanto, tendría que actuar sobre las uniones inespecíficas entre compuestos fenólicos y celulasas, provocando un aumento en la glucosa recuperada.

A la vista de estos resultados, con el fin de elucidar si las menores recuperaciones de glucosa eran causadas por la acción de los radicales fenoxilo, se incubaron las enzimas hidrolíticas (celulasas y β -glucosidasas) en ausencia de sustrato con lacasa y V. Las celulasas y β -glucosidasas se añadieron simultáneamente con la lacasa y la V, o tras 30 h de incubación de la lacasa y la V. Cuando las enzimas hidrolíticas se añadían simultáneamente, se observó una reducción del 55% y 66% de la actividad celulasa y β -glucosidasa, respectivamente. Por el contrario, la adición de las enzimas tras 30 h de incubación de lacasa y V no produjo ninguna disminución de las actividades. Este resultado confirma que las enzimas hidrolíticas son inhibidas por los radicales fenoxilo, ya que tras 30 h de incubación la mayoría de los radicales fenoxilo habrían reaccionado entre sí y no se encontrarían disponibles en el medio para reaccionar con las celulasas. En esta misma línea, Moreno 2013, Tesis Doctoral, incubaron las enzimas hidrolíticas en presencia de lacasa y el mediador sintético 1-hidroxibenzotriazol (HBT) observando un descenso de hasta un 66% y un 49% en la actividad celulasa y β -glucosidasa, respectivamente. Este resultado hace indicar que el radical HBT se comporta como un compuesto inhibidor para las enzimas hidrolíticas, apoyando los resultados obtenidos en la presente Tesis.

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los prehidrolizados obtenidos tras el pretratamiento por explosión por vapor de paja de trigo presentan una compleja mezcla de compuestos fenólicos, azúcares hemicelulósicos y otros inhibidores (furanos y ácidos carboxílicos). En este contexto, a parte del SA, AF y V, otros compuestos también podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre las celulasas. Por lo tanto, para evaluar el posible efecto de todos estos compuestos, se utilizó un prehidrolizado de paja de trigo, directamente o diluido al 50% (v/v), en hidrólisis enzimáticas de Sigmacell combinadas con el tratamiento con lacasa. Tras 72 h de hidrólisis enzimática en ausencia de lacasa, el ensayo con el prehidrolizado sin diluir dio lugar a una menor recuperación de glucosa en comparación con el ensayo con el prehidrolizado diluido (Artículo 2, Figura 5). Este resultado se debió a la mayor concentración de compuestos inhibidores en el prehidrolizado sin diluir. En comparación con el ensayo donde los tres fenoles se añadieron simultáneamente en ausencia de lacasa (Artículo 2, Figura 2), donde la recuperación de glucosa no se vio afectada, en los ensayos con el prehidrolizado sin diluir y diluido la recuperación de

glucosa fue un 58% y 32% menor, respectivamente. Estos resultados demuestran el efecto inhibitorio de los demás componentes del prehidrolizado sobre la hidrólisis enzimática, principalmente de los xilooligosacáridos (Kim y col., 2011, Ximenes y col., 2010; Qing y col., 2010). Interesantemente, la presencia de lacasa en ambos ensayos no afectó notablemente a la recuperación de glucosa final. Este hecho indica que la influencia de los otros componentes del prehidrolizado sobre las enzimas hidrolíticas puede estar enmascarando el efecto de los radicales fenoxilo derivados de la acción de la lacasa. Cabe destacar que, la recuperación de glucosa a las 4 h de hidrólisis enzimática de Sigmacell en presencia de prehidrolizado diluido o sin diluir con lacasa fue mayor que en los ensayos sin lacasa. Debido a que los compuestos fenólicos son inhibidores de celulasas (Ximenes y col. 2010), la rápida oxidación de los fenoles simples por la lacasa podría explicar las mayores recuperaciones de glucosa en las fases tempranas de hidrólisis. Kim y col. (2013b, 2011), observaron que la eliminación de los fenoles simples de los prehidrolizados mejoraba los rendimientos finales de hidrólisis. Por lo tanto, en nuestro ensayo, la eliminación de estos compuestos fenólicos por la acción de la lacasa evitaría la interacción de estos compuestos fenólicos con las enzimas hidrolíticas. Por otro lado, las mayores recuperaciones de glucosa en las fases tempranas de hidrólisis sugieren que en estas condiciones, los radicales fenoxilo no estarían implicados en la inhibición de la hidrólisis enzimática. En los ensayos con prehidrolizado no se observó ninguna diferencia en las recuperaciones de glucosa a las 24 h mientras que en los ensayos con Sigmacell en presencia de lacasa y V o SA la inhibición se observó a este tiempo de hidrólisis enzimática (Artículo 2, Figura 1b). La compleja composición fenólica del prehidrolizado podría estar promoviendo reacciones de polimerización entre los compuestos fenólicos en lugar de con las celulasas. Como consecuencia, la formación de estos polímeros podría estar afectando la hidrólisis enzimática en dos diferentes maneras: I) interaccionando directamente con las celulasas provocando su desactivación (Haven y col., 2013), II) formando precipitados sobre la fibra de celulosa, impidiendo la unión efectiva de las celulasas a la fibra.

La compleja composición fenólica del prehidrolizado daría lugar a una serie de compuestos fenólicos poliméricos muy distintos en estructura tridimensional al polímero resultante cuando hay un único fenol presente en el medio. Además, los fenoles poliméricos que se forman por la acción de la lacasa presentan un peso molecular entre 7 y 11 kDa y por tanto unas características en términos de solubilidad distintas a los de los fenoles simples (Ghoul y Chebil, 2012).

El aumento en las recuperaciones de xilosa a medida que avanza la hidrólisis enzimática pone de manifiesto cierta actividad xilanasa secundaria en los cócteles enzimáticos empleados (Alvira Tesis Doctoral, 2011). La eficiencia de hidrólisis para la xilosa fue de 85% y 100% para los ensayos con prehidrolizado sin diluir y diluido respectivamente, lo que indica que la hidrólisis enzimática de los xilooligosacáridos se ve mucho menos afectada por los compuestos fenólicos poliméricos que la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Debido a que el principal sustrato para las xilanasas son xilooligosacáridos solubles estas enzimas serían menos susceptibles a la inhibición por parte de los fenoles poliméricos. Por el contrario, la hidrólisis de la celulosa requiere la unión de las celulasas a su superficie mediante el módulo de unión a carbohidratos. La deposición de los fenoles poliméricos en la superficie de la celulosa limitaría el acceso de las celulasas. En este contexto, todos estos resultados anteriores sugieren que el principal mecanismo de inhibición de la hidrólisis enzimática en presencia de prehidrolizado de paja de trigo pretratada por explosión por vapor y lacasa sería la presencia de fenoles poliméricos.

A partir de los resultados anteriores se puede concluir que las condiciones de ensayo influyen en la reactividad de los radicales fenoxilo formados por la oxidación de la lacasa. La presencia de unos u otros fenoles simples en el medio provoca que sus respectivos radicales fenoxilo reaccionen directamente con las celulasas o polimericen entre ellos. En presencia de prehidrolizado donde hay una compleja composición de fenoles y otros inhibidores, el papel de los radicales fenoxilo queda enmascarado por otros mecanismos de inhibición.

4.3. Papel de la lignina en la inhibición de la hidrólisis enzimática en presencia de lacasa

Los resultados de hidrólisis enzimática sobre Sigmacell del artículo anterior mostraron claramente la implicación de los fenoles poliméricos y radicales fenoxilo formados por el tratamiento con lacasa en la inhibición de la hidrólisis enzimática. La influencia de uno u otro dependerá de las condiciones de ensayo hidrólisis enzimática, de la presencia de sustratos solubles e insolubles y de la compleja composición en compuestos fenólicos del prehidrolizado.

La presencia de la lignina se hace inevitable cuando se utilizan materiales lignocelulósicos reales en el proceso de producción de etanol. En este contexto, se realizó una serie de experimentos con lignina para destacar su papel en la inhibición de la hidrólisis enzimática. Los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor en presencia de lacasa descritos en el Artículo 1 de esta presente Tesis (Artículo 1, Material suplementario), muestran claramente que las lacasas pueden actuar sobre ciertas subunidades de la lignina alterando sus características estructurales. Estas modificaciones de la fibra de lignina pueden por un lado provocar que haya nuevas interacciones entre los polímeros de celulosa y lignina, y por otro lado pueden determinar el mecanismo de reacción de algunos compuestos fenólicos como se ha descrito anteriormente. En este sentido, en el artículo 1 se mencionó que ciertos compuestos fenólicos tales como el AC y el AF podrían repolimerizar sobre la fibra de lignina dificultando el avance de las enzimas celulolíticas. Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se propuso como siguiente objetivo de esta presente Tesis Doctoral estudiar si la presencia de lignina, así como los cambios originados en su estructura por la acción de la lacasa ejercen un efecto negativo sinérgico sobre la hidrólisis enzimática.

En primer lugar, se sometió al Sigmacell a hidrólisis enzimática en presencia de un extracto de lignina y los mismos fenoles simples empleados en los experimentos anteriores (V, SA y AF) en ausencia de lacasa. El extracto de lignina se obtuvo sometiendo al RSI de paja de trigo pretratada por explosión por vapor a una hidrólisis enzimática completa (15 UPF/ g PS + 15 UCB/ g PS, pH 5, 50 °C, 144 h) tras la cual el residuo sólido fue centrifugado y lavado. Considerando que la proporción celulosa:lignina en paja de trigo es cercano a 2:1 (Tomás-Pejó y col., 2009; Moreno y col., 2012a) este extracto de lignina se añadió a la hidrólisis enzimática en la misma proporción. La combinación de extracto de lignina y fenoles simples (Artículo 3, Figura 1a) provocó un descenso en la glucosa recuperada del 25% en comparación con el ensayo control con extracto de lignina sin fenoles. Cabe destacar que en el ensayo de hidrólisis enzimática de Sigmacell en ausencia de lignina (Artículo 2, Figura 1a), las mismas concentraciones de fenoles no produjeron ningún descenso en la glucosa recuperada, lo que confirma el efecto inhibitorio conjunto que ejerce el polímero de lignina y los fenoles simples en la hidrólisis enzimática. No obstante, en presencia de lignina se detectó un ligero aumento en la concentración de fenoles al final de la hidrólisis enzimática. Estos fenoles procederían de la degradación parcial de la lignina

durante la hidrólisis enzimática y por tanto, sería este aumento en la concentración de fenoles el causante de los menores rendimientos de hidrólisis.

Por otro lado, la combinación de la lacasa con lignina en ausencia de fenoles produjo un descenso la liberación de glucosa del 37% en comparación con el ensayo sin lacasa (Artículo 3, Figura 1b). Este resultado pone de manifiesto que el tratamiento con lacasa inhibe la hidrólisis enzimática al alterar directamente la estructura de la lignina. De hecho, el análisis por ATR-FTIR del RSR del ensayo tratado con lacasa mostró la misma reducción en la banda 1512 cm^{-1} observada en el espectro del RSR del RSI no lavado (Artículo 1, Material Suplementario y Artículo 3, Figura 2), lo que confirma la oxidación de las subunidades fenólicas del extracto de lignina por la lacasa (Liu y col., 2014). Esta modificación en la estructura de la lignina, apoyaría el mecanismo sugerido por Moilanen y col. (2011), donde el tratamiento con lacasa provocaría un fortalecimiento de las uniones lignina-carbohidrato en los materiales lignocelulósicos.

La presencia de fenoles produjo un descenso aún mayor de la glucosa final recuperada en comparación con el ensayo con únicamente lignina y lacasa (Artículo 3, Figura 1b). Tal y como se ha discutido previamente, este mayor descenso puede deberse a la interacción producida entre las celulasas y los fenoles poliméricos y/o los radicales fenoxilo originados por la acción de la lacasa. Como se ha comentado en la sección 4.1 de la discusión, la lacasa también puede catalizar la repolimerización de ciertos fenoles simples en la fibra de lignina, entre ellos el AF. Sin embargo, los espectros de infrarrojo de los RSR de los ensayos con lacasa y fenoles, no mostraron diferencias significativas de intensidad en comparación con el espectro del RSR del ensayo tratado con lacasa únicamente. En este contexto y bajo estas condiciones experimentales se puede concluir que el mecanismo de repolimerización (grafting) no es el principal mecanismo de inhibición.

Por otro lado, se midieron las concentraciones de celobiosa obtenidas durante la hidrólisis enzimática de Sigmacell en presencia de extracto de lignina, lacasa y fenoles. En este caso, tanto la presencia de lacasa como la acción combinada de los fenoles y la lacasa provocaron un descenso en la concentración de celobiosa tras 4 h de hidrólisis enzimática. Además, en ambos casos no se detectó celobiosa tras 24 h de hidrólisis enzimática (Artículo 3, Figura 3). Tanto las endoglucanasas como las celobiohidrolasas se ven mucho más afectadas por el tratamiento por lacasa que las β -glucosidasas en las primeras fases de hidrólisis enzimática debido a que la celobiosa es el producto final de las dos primeras (Moilanen y col., 2011; Ximenes y col., 2011).

Los ensayos anteriores han puesto de manifiesto el efecto sinérgico negativo de la lignina y los fenoles sobre la hidrólisis enzimática de un sustrato celulósico modelo tras el tratamiento con lacasa. Con el objetivo de comprobar este efecto sinérgico sobre material lignocelulósico, se sometieron el RSI y el MPC de paja de trigo pretratada por explosión por vapor a hidrólisis enzimática en presencia de lacasa. En el caso particular del RSI, al carecer prácticamente de compuestos fenólicos solubles, se añadieron V, SA y AF para observar el efecto de estos fenoles en la hidrólisis enzimática. En el caso del MPC, al contener los compuestos fenólicos presentes en la fase líquida, la suplementación con fenoles no fue necesaria. En estos ensayos, la presencia de fenoles sin lacasa, no causó un descenso en la recuperación final de glucosa en comparación con el ensayo de hidrólisis enzimática con Sigmacell y fenoles sin lacasa (Artículo 3, Figura 1a). Aunque estos resultados puedan parecer contradictorios, es necesario tener en cuenta que la proporción de celulasa:lignina influye directamente en la cantidad de celulasa que quede disponible en el medio. Cuanto mayor sea la cantidad de lignina, más celulastas podrían quedar inespecíficamente adheridas a su superficie y por tanto podrían obtenerse menores rendimientos de hidrólisis. En este contexto, en el ensayo de hidrólisis enzimática con Sigmacell el ratio celulosa:lignina era de 2:1 lo que significaba un ratio celulasa:lignina de 10 UPF/g lignina y 10 UCB/g lignina. En cambio, en el ensayo de hidrólisis enzimática con el RSI el ratio celulasa:lignina era un 40% más alto lo que se tradujo en una relación celulasa:lignina de 14 UPF(UCB)/g lignina. En este último caso, la cantidad de celulasa potencialmente libre y activa sería mayor, lo que provocaría que el efecto de los fenoles simples sobre la hidrólisis enzimática no fuera tan evidente.

La suplementación con lacasa del ensayo con RSI tanto en presencia como en ausencia de fenoles provocó un descenso en la glucosa recuperada, no observándose diferencias significativas entre los diferentes ensayos (Artículo 3, Figura 4a). Este resultado sugiere que las menores recuperaciones de glucosa pueden ser debidas a las modificaciones producidas por la lacasa en el polímero de lignina en vez de a los fenoles poliméricos. En cuanto al ensayo de hidrólisis enzimática con el MPC, la presencia de lacasa provocó una reducción en la glucosa final de un 39% (Artículo 3, Figura 7a). A pesar de que la proporción de lignina en el MPC es mucho menor que en el RSI, la reducción de la recuperación de glucosa fue ligeramente más elevada que en el caso de la hidrólisis enzimática el RSI en presencia de lacasa (32%). Este resultado indica que los diferentes compuestos fenólicos presentes en el MPC y las reacciones

cruzadas que pueden establecerse entre ellos tras el tratamiento con lacasa contribuirían en un mayor grado a la inhibición de la hidrólisis.

Al igual que en el ensayo de hidrólisis enzimática con Sigmacell en presencia de lignina, en los ensayos con RSI y MPC suplementados con lacasa hubo un descenso en la concentración de celobiosa a las 4 h (Artículo 3, Figura 5). En el caso del RSI, los fenoles causaron un mayor descenso en los niveles de celobiosa a las 4 h en comparación con el ensayo tratado únicamente con lacasa, sugiriendo también la participación de los fenoles poliméricos en la inhibición de la hidrólisis enzimática (Artículo 3, Figura 5). Además, esta inhibición sería dependiente del tipo de fenol, ya que la adición de AF y lacasa dio lugar las menores recuperaciones de celobiosa. Este resultado vuelve a confirmar el distinto comportamiento de los compuestos fenólicos tras la oxidación por lacasa (Aracri y col., 2010; Sun y col., 2013). En este sentido, el AF estaría probablemente repolimerizándose sobre la fibra de lignina lo que provocaría una reducción de los sitios de unión a la celulosa de las endoglucanasas y celobiohidrolasas.

Por otra parte, como se ha comentado en el párrafo anterior y se discutió en el Artículo 2 no todas las actividades enzimáticas presentes en los cócteles comerciales de celulasas se ven afectadas de la misma manera. En este sentido, el cóctel Celluclast 1.5L posee una cierta actividad secundaria xilanolítica, por lo que se midió la xilosa final en los ensayos con RSI y MPC. La presencia de lacasa provocó una disminución en la xilosa final en ambos ensayos (Artículo 3, Figura 4b; Figura 7b). Cuando el sustrato empleado fue el MPC, no se observaron diferencias en la recuperación de xilosa a las 4 h de hidrólisis enzimática en comparación con su respectivo ensayo control sin lacasa. En cambio, la adición de lacasa provocó un descenso claro en los niveles de xilosa recuperada a las 4 h cuando el sustrato empleado fue el RSI. Este hecho indica que dependiendo del tipo de sustrato la actividad xilanasa se ve más o menos afectada. Esta diferencia en las recuperaciones de xilosa puede deberse a que el xilano que queda en el RSI se encuentra en forma insoluble en casi su totalidad, mientras que en el MPC se encuentra en forma soluble. Este resultado está en concordancia con los resultados de recuperación de xilosa obtenidos en la hidrólisis enzimática de Sigmacell en presencia de prehidrolizado donde la actividad xilanasa se veía menos afectada por el tratamiento con lacasa que la actividad celulasa (Artículo 2, Figura 5). La menor recuperación de xilosa observada en los ensayos con MPC tras el tratamiento con lacasa en comparación

con el ensayo con Sigmacell y prehidrolizado pone otra vez de manifiesto el papel inhibitorio de la lignina en la hidrólisis enzimática.

Todos estos resultados demuestran el papel crucial que ejerce la lignina sobre la hidrólisis enzimática. La presencia de lacasa provoca la modificación de la estructura de la lignina lo que se traduce en menores rendimientos de hidrólisis enzimática debido a que aumentan las uniones inespecíficas de las celulasas. Además, la reincorporación de los polímeros fenólicos sobre la fibra limita el acceso de las enzimas hidrolíticas. La proporción celulasa:lignina, la concentración de fenoles, así como la estructura del fenol y el tipo de sustrato empleado son factores que influirán directamente en el rendimiento de la hidrólisis enzimática cuando se suplementa el medio con lacasa.

4.4. Efecto de la dosis de lacasa en la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor

A la vista de los resultados obtenidos y a la gran influencia que ejerce la lignina sobre la hidrólisis enzimática tras el tratamiento con lacasa, el estudio y optimización de la dosis de lacasa puede contribuir a reducir las modificaciones en la estructura de la lignina y limitar la cantidad de radicales fenoxilo y/o fenoles poliméricos.

Qiu y Chen (2012) observaron un descenso en el rendimiento de hidrólisis enzimática al emplear dosis de lacasa superiores a 0,55 UI/g PS de paja de trigo pretratada por explosión por vapor.

Hay que destacar que en un principio, el principal objetivo de la utilización de lacasas era deslignificar los materiales lignocelulósicos para obtener mejores rendimientos de hidrólisis enzimática (Moreno y col., 2015). Las dosis de lacasa que pueden emplearse con el fin de deslignificar van desde dosis bajas (0,03-10 UI/ g PS) a dosis realmente altas (4000-80000 UI/ g PS) (Chen y col., 2012; Qiu y Chen, 2012). No obstante, las dosis de lacasa empleadas en esta Tesis Doctoral provocaron un aumento en el porcentaje de lignina Klason cuando se emplearon sobre paja de trigo pretratada por explosión por vapor (Artículo 1).

Debido al aumento de lignina y a la disminución de los rendimientos de hidrólisis mediante diferentes mecanismos, el siguiente objetivo que se planteó en la presente Tesis fue el de comprobar el efecto de distintas dosis de lacasa sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor. Para ello, se utilizaron como sustrato el RSI y el MPC al 10% (p/v) PS de consistencia en presencia

de 0,1, 0,5, 5 y 10 UI de lacasa /g PS de sustrato. La recuperación de glucosa y xilosa para ambos sustratos a las 6 h de hidrólisis enzimática no se vieron afectadas independientemente de la dosis de lacasa. No obstante, tras 48 h de hidrólisis se observaron diferencias en la recuperación de glucosa en ambos sustratos para todas las dosis de lacasa (Artículo 4, Figura 3). Por el contrario, la recuperación de xilosa no se vio afectada a excepción de la dosis más alta de lacasa (10 UI/g PS) con el MPC en donde el análisis ANOVA mostró diferencias significativas (Artículo 4, Figura 2a). Este resultado vuelve a sugerir que la actividad xilanolítica de los cócteles se ve menos afectada que la actividad celulasa por el tratamiento por lacasa, y que únicamente dosis altas de lacasa pueden afectar levemente a su actividad. Aunque el tratamiento con lacasa produjo menores recuperaciones de glucosa a las 48 h con casi todas las dosis empleadas, el análisis ANOVA mostró que no había diferencias significativas utilizando 0,1 UI/g PS de sustrato comparado con el ensayo control sin lacasa (Artículo 4, Figura 3). El análisis por ATR-FTIR de los RSR del RSI y el MPC mostró una menor intensidad en la banda 1512 cm^{-1} a medida que se aumentaba la dosis de lacasa (Artículo 4, Figura 4), lo que constata la probable relación entre la dosis de lacasa y el número de modificaciones producidas en el polímero de lignina. Como se ha mencionado con anterioridad, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es obtener una integración eficaz de la etapa de destoxificación con enzimas lacasas en el proceso de producción de etanol. En este contexto, se evaluó el porcentaje de eliminación de fenoles totales del MPC tras 4, 6 y 24 h de hidrólisis enzimática donde las lacasas se añadieron simultáneamente junto a las celulasas (Artículo 4, Figura 1). Independientemente de la dosis de lacasa empleada, se observó una reducción significativa de fenoles a las 6 h de hidrólisis. No obstante, tras 6 h no se observaron diferencias significativas en la concentración de fenoles totales. Este resultado sugiere que la eliminación de fenoles es sólo efectiva a primeras horas de la destoxificación (Jurado y col., 2009). Con 0,1 UI de lacasa/g PS de sustrato se consiguió eliminar el 45% del contenido fenólico del MPC a las 6 h, no obstante, con 0,5, 5 y 10 UI de lacasa/g PS de sustrato la eliminación fue del 76%, 79% y 85%, respectivamente.

La dosis de lacasa máxima para no producir un efecto negativo sobre la hidrólisis enzimática fue 0,1 UI/g PS de sustrato. Sin embargo, esta dosis, sólo pudo eliminar la mitad del contenido fenólico del MPC que podría no ser suficiente para reducir el carácter inhibitorio del MPC sobre los microorganismos fermentadores. En este sentido, se realizó un experimento de SFS utilizando el MPC diluido al 10% (p/v)

PS y *K. marxianus* CECT 10875 como microorganismo fermentador. Las enzimas hidrolíticas se añadieron simultáneamente con la lacasa (0,1 UI/g PS de lacasa), por lo que habría que considerar una etapa de presacarificación + destoxificación de 6 h a 50 °C antes de la inoculación de las levaduras. La etapa de SFS se desarrolló a 42 °C por ser la temperatura óptima de crecimiento para *K. marxianus*. El tratamiento con lacasa redujo el contenido en total de fenoles solubles en un 58% antes de la inoculación del microorganismo.

Cabe mencionar que el material empleado en las SFS fue pretratado a 200 °C y 7 minutos. La elección de estas nuevas condiciones de pretratamiento se debió a los resultados previos que mostraron un fuerte carácter inhibitorio del MPC obtenido a 200 °C y 10 minutos incluso tras destoxificar con 10 UI/g PS de lacasa (Artículo 4, Figura 5). Este resultado pone de manifiesto la importancia de optimizar las condiciones del pretratamiento y tener en cuenta el factor de severidad. La severidad del pretratamiento es un factor que influye directamente en la concentración de los distintos compuestos inhibidores. Según análisis de optimización previos llevados a cabo en el CIEMAT (resultados no publicados), las temperaturas óptimas de pretratamiento para paja de trigo en base a rendimientos de hidrólisis enzimática, se sitúan en el rango de 200-230 °C. No obstante, el factor de severidad también está influido por el tiempo de residencia. Tiempos largos de residencia aumentarían la accesibilidad de la celulosa para las enzimas hidrolíticas, pero conllevarían a un aumento de los compuestos inhibidores. Dada la estrecha relación que existe entre las condiciones a las que se realiza el pretratamiento y la formación de compuestos inhibidores, la optimización de las condiciones de pretratamiento es imprescindible. En este contexto, aunque las condiciones de pretratamiento de 200 °C-10 minutos daban lugar a mayores rendimientos de hidrólisis, los compuestos inhibidores producidos redujeron totalmente la capacidad fermentativa de *K. marxianus*, incluso tras la eliminación de los compuestos fenólicos por la lacasa. Por lo tanto, se llegó a un compromiso en las condiciones de pretratamiento, donde los rendimientos de hidrólisis no se vieran tan afectados y se disminuyese la concentración de inhibidores.

Por otro lado, aunque la concentración de fenoles totales del MPC obtenido tras un tiempo de residencia de 10 minutos fuera similar al MPC obtenido tras 7 minutos de tiempo de residencia (Artículo 4, Tabla 1), la composición en el contenido fenólico puede ser distinta. La diferencia en la composición de la fracción fenólica puede explicar la mayor reducción de fenoles totales en el ensayo de SFS que en el ensayo de

hidrólisis enzimática (Artículo 4). A pesar de la reducción de fenoles totales antes de la inoculación del microorganismo, tras 72 h de SFS la producción de etanol fue muy baja (Artículo 4 Figura 6), lo que indica una inhibición del microorganismo.

En conclusión, la estrategia de SFS al 10% (p/v) de PS de MPC con una etapa de destoxificación previa suplementada con 0,1 UI/g PS de sustrato no fue capaz de evitar la inhibición del crecimiento de *K. marxianus*, puesto que esta dosis de lacasa únicamente pudo eliminar el 58% de los fenoles solubles, siendo insuficiente para reducir el carácter inhibitorio del MPC.

4.5. Optimización de la etapa de destoxificación con lacasa en procesos de HFH con *K. marxianus* CECT 10875

A la vista de los resultados de SFS obtenidos en el Artículo 4 es necesario utilizar una dosis de lacasa óptima que permita reducir la toxicidad del MPC y que no afecte negativamente a la etapa de hidrólisis enzimática. Por ello, la optimización de la dosis de lacasa para destoxificar el MPC se hace imprescindible para conseguir una eficiente integración de etapa de destoxificación.

Como se ha comentado, dosis de lacasa superiores a 0,1 UI/g PS provocaron un efecto inhibitorio en la hidrólisis enzimática y por tanto menores recuperaciones de glucosa. En este sentido, una estrategia de hidrólisis separada de la destoxificación y la fermentación (HyDyF) donde la etapa de destoxificación se realizaría después de la etapa de hidrólisis, sería apropiada para evitar la inhibición producida por la lacasa. Aunque en esta estrategia cada etapa del proceso tiene lugar a sus condiciones óptimas, ésta presenta como principal desventaja la inhibición de las celulasas por producto final disminuyendo así el rendimiento de hidrólisis enzimática. En este contexto, una estrategia de hidrólisis y fermentación híbrida (HFH) con una etapa de presacarificación previa seguida de una etapa de destoxificación con lacasas podría ser una alternativa apropiada puesto que presentaría las siguientes ventajas:

(1) La separación de la hidrólisis enzimática en sus fases iniciales en la que las endoglucanasas y las celobiohidrolasas estarían actuando principalmente sobre la fibra de celulosa. Estas enzimas se ven más afectadas por el tratamiento con lacasa y se evitaría así su inhibición.

(2) Se favorecería la homogenización del medio y una mejor distribución de la lacasa y de las levaduras lo que incrementaría las velocidades de reacción y/o asimilación (Moreno y col., 2013; Tomás-Pejó y col., 2009).

(3) Se permitiría una mejor integración de las diferentes etapas reduciendo el tiempo global del proceso y aumentando los rendimientos de producción de etanol.

Además, la utilización de levaduras termotolerantes como *K. marxianus* CECT 10875, capaz de realizar la fermentación a temperaturas superiores a 40 °C, permitiría una mejor integración de las etapas de sacarificación y fermentación dando lugar a mayores rendimientos de hidrólisis y por tanto mayores concentraciones de etanol (Nonklang y col., 2008).

Por todo ello, el último objetivo de la presente Tesis es evaluar el efecto de varias dosis de lacasa, tiempo de destoxificación y el tamaño de inóculo de levadura en procesos HFH en términos de producción de etanol, productividad volumétrica. Para ello se evaluó el efecto de diferentes dosis de lacasa y diferentes tiempos de destoxificación en términos de glucosa recuperada utilizando MPC al 10% PS (p/v). Asimismo, también se evaluó el efecto de la dosis de lacasa, tiempo de destoxificación y la dosis de inóculo en términos de concentración y productividad volumétrica de etanol en un proceso de HFH. Para analizar todas estas variables se empleó un diseño experimental de nueve ensayos con un punto central (Artículo 5, Tabla 2).

Para comprobar que la suplementación con lacasa favorece la eliminación de fenoles totales y mejora la fermentabilidad del MPC, se llevó a cabo un ensayo de HFH preliminar siguiendo la misma estrategia equivalente al punto central del diseño experimental pero sin adición de lacasas (Artículo 5, Tabla 2, ensayo 9). En ese caso, tras 72 h de proceso de HFH, no hubo consumo de glucosa ni producción de etanol independientemente de la carga de inóculo de levadura (1 o 3 g/L PS). Este resultado confirmó la elevada toxicidad del MPC bajo estas condiciones de proceso. En este contexto, la adición de lacasa como método de destoxificación del MPC sería muy apropiada.

De acuerdo al diseño de experimentos, los diferentes ensayos de HFH se suplementaron con 0,5, 2,75 y 5 UI/g PS de lacasa durante 4, 8 y 12 h. La dosis de 0,1 UI/g PS se descartó debido a que no era suficiente para mejorar la fermentabilidad del MPC. Transcurrido el tiempo de destoxificación se midieron los fenoles totales (Artículo 5, Figura 1). La suplementación con 0,5 UI/g PS de lacasa produjo una reducción del contenido fenólico cercano al 70% y la adición de cargas más altas de lacasa produjeron

una disminución en el contenido fenólico cercano al 80%. La eliminación del 70% del contenido fenólico fue suficiente para reducir la toxicidad del MPC por lo que la dosis mínima de lacasa óptima sería 0,5 UI/g PS. Estos resultados concuerdan con Jurado y col. (2009) donde observaron que 0,5 UI/ g PS de lacasa fue la dosis mínima necesaria para reducir la toxicidad del MPC de paja de trigo explosionada usando a *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador. Cabe destacar que tiempos de destoxificación mayores de 4 h no implicaron mayores eliminaciones de fenoles. El hecho de no poder alcanzar mayores porcentajes de eliminación de fenoles podría deberse a la naturaleza recalcitrante de los restantes compuestos fenólicos presentes en el MPC o bien a una desactivación de la lacasa. Esta última suposición estaría de acuerdo con los resultados de Kunamneni y col. (2008), los cuales observaron una desactivación de LMt cercana al 20% tras 12 h de incubación. Por otro lado, la recuperación de glucosa tras las 12 h de hidrólisis fue aproximadamente 15 g/L en todos los ensayos (Artículo 5, Tabla 2), correspondiéndose con un 40% de eficiencia de hidrólisis enzimática. Tras 20 h de hidrólisis en los ensayos preliminares de HFH sin lacasa, la recuperación de glucosa fue de unos 23g/L. Por otro lado, la recuperación de glucosa en el ensayo con 12 h de hidrólisis más 8 h de destoxificación (ensayo 9), fue también de unos 23 g/L (Artículo 5, Tabla 3). Este resultado indicó que la adición de lacasa tras 12 h de hidrólisis no produce efecto inhibitorio sobre la hidrólisis enzimática, sugiriendo que la estrategia de 12 h de presacarificación más 4 o 8 h de destoxificación es una estrategia prometedora.

Tras las etapas de hidrólisis y destoxificación a 50 °C la temperatura del proceso se redujo a 42 °C, óptima para *K. marxianus* CECT 10875. La dosis de inóculo fue de 1, 2 o 3 g/L PS de acuerdo con el diseño experimental (Artículo 5, Tabla 2). Como se ha comentado con anterioridad, el efecto de la dosis de lacasa, tiempo de destoxificación y carga de inóculo fueron evaluados en términos de producción y productividad volumétrica de etanol. Según el análisis estadístico de Pareto, la dosis de lacasa no tuvo efecto estadísticamente significativo tanto en la producción de etanol como en la productividad volumétrica (Artículo 5, Figura 2a). No obstante, el tiempo de destoxificación mostró un efecto negativo estadísticamente significativo sobre la producción de etanol. En términos de productividad volumétrica de etanol, el tiempo de destoxificación no tuvo un efecto estadísticamente significativo a las 6 h de HFH, en cambio, mostró tener un efecto negativo a las 24 h de proceso (Artículo 5, Figura 3). En el caso de la carga de inóculo, ésta tuvo un efecto positivo estadísticamente significativo tanto en la producción como en la productividad volumétrica de etanol (Artículo 5,

Figuras 2 y 3). En este contexto, aunque la reducción de fenoles totales fue menor con 0,5 UI/g PS de lacasa (Artículo 5, Figura 1, ensayos 1 y 2), 4 h de destoxificación fueron suficientes para evitar el efecto inhibitorio del MPC sobre la levadura (Artículo 5, Tabla 3). No obstante, no se detectó producción de etanol en los ensayos con 12 h de destoxificación y 1 g/L de inóculo (Artículo 5, Tabla 3, ensayos 5 y 7). Por el contrario, los ensayos que fueron inoculados con 3 g/L PS de levadura y 12 h de destoxificación mostraron las mismas concentraciones de etanol que los ensayos con 4 h de destoxificación y 1 o 3 g/L PS de inóculo (Artículo 5, Tabla 3, ensayos 1-4 vs 6 y 8). El impacto positivo que tiene la carga de inóculo sobre la concentración y productividad volumétrica de etanol se debe probablemente a que cargas altas de inóculo implican mayores tasas de consumo de azúcares y asimilación de tóxicos. Este hecho pone de manifiesto que cargas altas de inóculo pueden evitar el efecto negativo que ejercen tiempos largos de destoxificación sobre la concentración y productividad volumétrica de etanol.

El efecto negativo de los tiempos largos de destoxificación podría deberse al incremento de la cantidad de ácido acético en el medio producto de la hidrólisis de los grupos acetilos de las hemicelulosas debido a actividad acetil esterasa presente en los cócteles de celulasas (Alvira y col., 2010; Juhasz y col., 2005). De hecho, los niveles de ácido acético tras las 12 h de hidrólisis aumentaron un 8,8% en todos los ensayos. Este incremento fue mucho más evidente tras 16 h y 24 h de hidrólisis y destoxificación, observándose un aumento en la concentración de ácido acético del 23,8% y del 27,2%, respectivamente. Por lo tanto, en estas condiciones, a pesar de la alta eliminación de fenoles totales por la acción de la lacasa, tiempos largos de destoxificación (12 h) favorecerían el aumento en la concentración de ácido acético lo que inhibiría también la capacidad fermentativa de *K. marxianus*. Aunque altas cargas de inóculo pudieron aliviar el efecto negativo de los demás tóxicos presentes en el MPC tales como ácidos alifáticos, derivados del furano y compuestos fenólicos recalcitrantes para la lacasa, las concentraciones de etanol máximas que se obtuvieron fueron 10 g/L (Artículo 5, Tabla 3), independientemente de las condiciones de ensayo. Hay que tener en cuenta que la concentración máxima de etanol potencialmente alcanzable sería de 19 g/L lo que indica que a pesar de la eliminación de la mayor parte de los compuestos fenólicos, *K. marxianus* presenta una alta susceptibilidad a los demás inhibidores del MPC.

En conclusión, el tratamiento con lacasas es una estrategia muy apropiada para reducir el carácter inhibitorio del MPC de paja trigo pretratada por explosión por vapor.

La adición de lacasas permite la utilización de medios altamente tóxicos que no eran fermentables sin la adición de lacasas. Los resultados obtenidos indican que una estrategia de HFH, donde haya una etapa de presacarificación previa a la etapa de destoxificación permite aliviar el efecto negativo del tratamiento con lacasa sobre la hidrólisis enzimática. A su vez, estos resultados indican la importancia de optimizar la dosis de lacasa, así como el tiempo de destoxificación con el objetivo de evitar bajas concentraciones y productividades volumétricas de etanol.

No obstante, debido a las temperaturas elevadas a las que se lleva a cabo la etapa de fermentación (42 °C), la susceptibilidad de *K. marxianus* frente a los otros tóxicos es mayor. En este contexto, la eliminación y/o reducción de los demás inhibidores (ácidos alifáticos y furanos), puede ser una estrategia acertada para mejorar la capacidad fermentativa de *K. marxianus*. La optimización de estrategias de propagación o el desarrollo de cepas recombinantes que sobreexpresen genes implicados en la resistencia a los tóxicos y el estrés, pueden ser estrategias eficaces que ayuden a aumentar los rendimientos de producción de etanol, ayudando a la vez a reducción de los costes de producción.

En la presente Tesis Doctoral, se ha abordado el estudio y la integración eficaz del tratamiento con enzimas lacasas en el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa, optimizando la dosis de lacasa y el tiempo de destoxificación. No obstante, con vistas a una todavía mayor integración de todas las etapas de proceso, las lacasas podrían ser expresadas mediante metodologías de integración y modificación genética en los microorganismos fermentadores. Por lo tanto, la obtención de una levadura termotolerante que sea capaz de secretar lacasas, sea resistente a los diferentes compuestos inhibidores del MPC y a la vez produzca las enzimas hidrolíticas, sería una estrategia prometedora para conseguir un mayor rendimiento global en el proceso y que el bioetanol lignocelulósico fuera más económicamente competitivo.

5. Conclusiones

1. El efecto que la adición de lacasa produce sobre la hidrólisis enzimática es dependiente del tipo de lacasa.
2. El papel inhibitorio sobre las enzimas hidrolíticas que ejercen los radicales fenoxilo y los polímeros fenólicos originados por el mecanismo de polimerización oxidativa por la lacasa, viene determinado por la composición fenólica durante la hidrólisis enzimática.
3. El grado de inhibición y la reactividad de los diferentes compuestos fenólicos es dependiente de su estructura. La complejidad y diversidad en la composición del prehidrolizado influye en el grado de inhibición de la hidrólisis enzimática.
4. La lignina juega un papel determinante en la inhibición de la hidrólisis enzimática en presencia de lacasas. En este sentido, la proporción de lignina, la relación celulosa:lignina así como el tipo de sustrato utilizado (RSI o MPC), son factores importantes en la inhibición de la hidrólisis enzimática.
5. La utilización de una dosis óptima de lacasa consigue reducir el impacto negativo que ejercen las modificaciones en la lignina producidas por la lacasa sobre la hidrólisis enzimática.
6. Dosis de lacasa (0,5 UI/g PS de lacasa) inferiores a las utilizadas normalmente en procesos de destoxificación (10 UI g/ PS lacasa) son suficientes para reducir la toxicidad del MPC al emplear *K. marxianus* CECT 10875. Sin embargo, es necesaria la optimización del tiempo de destoxificación para mejorar las concentraciones y productividades volumétricas de etanol.
7. La configuración HFH, donde se realiza una etapa previa de presacarificación antes de la etapa de destoxificación consigue minimizar el efecto negativo que ejerce el tratamiento con lacasa sobre la hidrólisis enzimática.

6. Bibliografía

- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin B: **Biomass pretreatment: Fundamentals toward application.** *Biotechnology Advances* 2011, 29:675–685.
- Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF: **Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007, **82**:340-349.
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ: **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:4851-4861.
- Alvira P: **Estudio y formulación de nuevos cócteles enzimáticos para la mejora de la producción de etanol a partir de paja de trigo.** Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid 2011.
- Andreu G, Vidal T: **Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* and phenolic compounds: Can the efficiency of an enzyme mediator for delignifying kenaf pulp be predicted?** *Bioresource Technology* 2013, **131**:536-540.
- Aracri E, Fillat A, Colom JF, Gutiérrez A, del Río JC, Martínez AT, Vidal T: **Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:8211-8216.
- Aracri E, Roncero MB, Vidal T: **Studying the effects of laccase-catalysed grafting of ferulic acid on sisal pulp fibers.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:7555-7560.
- Arias ME, Arenas M, Rodríguez MJ, Soliveri J, Ball AS, Hernández M: **Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335.** *Applied Environmental Microbiology* 2002, **69**:1953-1958.
- Ballesteros M, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I: **Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.** *Process Biochemistry* 2004, **39**:1843–1848.

- Ballesteros M, Sáez F, Ballesteros I, Manzanares P, Negro MJ, Martínez JM, Castañeda R, Oliva JM: **Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, **161**:423-431.
- Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M: **Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, **129**:496-508.
- Bamaga O, Thakur M, Verma M: **Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling.** *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America* 2003, **34**:53-58.
- Bansal N, Kanwar SS: **Peroxidase(s) in Environment Protection.** *The Scientific World Journal* 2013, **2013**:714639.
- Barman DN, Haque MA, Kang TH, Kim MK, Kim J, Kim H, Yun HD: **Alkali pretreatment of wheat straw (*Triticum aestivum*) at boiling temperature for producing a bioethanol precursor.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2012, **76**:2201-22077.
- Barneto AG, Aracri E, Andreu G, Vidal T: **Investigating the structure–effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps.** *Bioresource Technology* 2012, **112**:327-335.
- Berka RM, Schneider P, Golightly EJ, Brown SH, Madden M, Brown KM, Halkier T, Mondorf K, Xu F: **Characterization of the Gene Encoding an Extracellular Laccase of *Myceliophthora thermophila* and Analysis of the Recombinant Enzyme Expressed in *Aspergillus oryzae*.** *Applied Environmental Microbiology* 1997, **63**:3151-3157.
- Bidlack J, Malone M, Benson R: **Molecular structure and components integration of secondary cell walls in plants.** *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences* 1992, **75**:51-56.
- Brennan L, Owende P: **Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010, **14**:557-577.

- Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I: **Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization.** *Plant Physiology* 2008, **147**:779–789.
- Brown RM: **Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century?** *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2004 **42**:487-495.
- Buranov AU, Mazza G: **Lignin in straw of herbaceous crops.** *Industrial Crops and Products* 2008, **28**:237-259.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT: **Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites.** *Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**:10324-10330.
- Canfora L, Iamarino G, Rao MA, Gianfreda L: **Oxidative Transformation of Natural and Synthetic Phenolic Mixtures by *Trametes versicolor* Laccase.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, **56**:1398-1407.
- Cannella D, Jørgensen H: **Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production?** *Biotechnology and Bioengineering* 2014, **111**:59-68.
- Canilha L, Carvalho W, Felipe MGA, Silva JBA: **(2008) Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation.** *Brazilian Journal of Microbiology* 2008, **39**:333-336.
- Cañas AI, Camarero S: **Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes.** *Biotechnology Advances* 2010, **28**:694-705.
- Cardona CA, Sánchez OJ: **Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities.** *Bioresource Technology* 2007, **98**:2415-2457. Cardona CA, Quintero JA, Paz IC: **Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:4754-4766.
- Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC: **Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501.** *Bioresource Technology* 2007, **98**:1947–1950.

Chandel AK, Singh OV, Chandrasekhar G, Rao LV, Narasu ML: **Bioconversion of novel substrate, *Saccharum spontaneum*, a weedy material into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498.** *Bioresource Technology* 2011a, **102**:1709-1714.

Chandel, A.K., Singh, O.V., Narasu, M.L. & Rao, LV: **Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS3.** *New Biotechnology* 2011b, **28**:593-599.

Converti A, Domínguez JM, Perego P, Silva SS, Zilli M: **Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production.** *Chemical Engineering and Technology* 2000, **23**:1013-1020.

Directiva 2009/28/CE del parlamento europeo y del consejo. 2009.

Dien BS, Ximenes EA, O'Bryan PJ, Moniruzzaman M, Li X-L, Balan V, Dale B, Cotta MA: **Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol.** *Bioresource Technology* 2008, **99**:5216-5225.

Duque A, Manzanares P, Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Sáez F, Ballesteros M: **Optimization of integrated alkaline-extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis.** *Process Biochemistry* 2013, **48**:775-781.

Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A: **Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2011, **68**:117-128.

Eggert C, Temp U, Eriksson KL: **The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase.** *Applied and Environmental Microbiology* 1996, **62**:1151-1158.

Faga BA, Wilkins MR, Bana IM: **Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:2273-2279.

- Faure D, Bouillant ML, Bally L: **Comparative Study of Substrates and Inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* Laccases.** *Applied Environmental Microbiology* 1995, **61**:1144-1146.
- Ferreira S, Gil N, Queiroz JA, Duarte AP, Domingues FC: **An evaluation of the potential of *Acacia dealbata* as raw material for bioethanol production.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:4766-4773.
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK: **The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential.** *Applied Microbiology Biotechnology* 2008, **79**:339-354.
- Galbe M, Zacchi G: **A review of the production of ethanol from softwood.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, **59**:618-628.
- Ghoul M, Chebil L: **Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases** En: Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2012.
- Gómez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ: **Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls.** *New Phytologist* 2008, **178**:473-485.
- Heitner C, Dimmel DR, Schmidt JA: **Lignin and lignans advances in biochemistry.** In CRC Press Taylor & Francis Group, 2010.
- García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanares P, Ballesteros M, Ballesteros I, González A, Negro MJ: **Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.** *Fuel* 2011, **90**:1624-1630.
- Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, Slininger PJ, Liu ZL, Skory CD: **Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, **71**:339-349.
- Grzenia DL, Schell DJ, Wickramasinghe SR: **Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction.** *Journal of Membranes Science* 2010, **348**:6-12.
- Hasunuma T, Kondo A: **Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains.** *Process Biochemistry* 2012, **47**:1287-1294.

Haven MO, Jørgensen H: **Adsorption of β -glucosidases in two commercial preparations onto pretreated biomass and lignin.** *Biotechnology for Biofuels* 2013, **6**:165.

Hendriks ATW, Zeeman G: **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology* 2009, **100**:10–18.

Hofrichter M: **Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).** *Enzyme and Microbial Technology* 2002, **30**:454-466.

<http://www.betarenewables.com>. **Sitio web Beta Renewables S.p.A.**

<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>. **Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales.**

Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH: **Novel enzymes for the degradation of cellulose.** *Biotechnology for Biofuels* 2012, **5**:45.

Ibarra D, del Río JC, Gutiérrez A, Rodríguez IM Romero J, Martínez MJ, Martínez AT, 2004. **Isolation of high-purity residual lignins from eucalypt paper pulps by cellulase and proteinase treatments followed by solvent extraction.** *Enzyme and Microbial Technology* 2004, **35**:173-181.

Ibarra D, Camarero S, Romero J, Martínez MJ, Martínez AT: **Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006, **66**:2052-2056.

Jeon JR, Kim EJ, Murugesan K, Park HK, Kim YM, Kwon JH, Kim WG, Lee JY, Chang YS: **Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis.** *Microbial Biotechnology* 2010, **3**:324-335.

Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C: **Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2007, **1**:119-134.

- Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L: **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochemistry* 2005, **40**:3519-3525.
- Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá A, Martínez AT, Martínez MJ: **Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol.** *Bioresource Technology* 2009, **100**:6378-6384.
- Kahar P, 2013. **Synergistic effects of pretreatment process on enzymatic digestion of rice straw for efficient ethanol fermentation.** En: Petre, M. (Ed.), *Environmental biotechnology-new approaches and prospective applications*. InTech, Rijeka, pp. 65–87, 2013.
- Kim Y, Ximenes E, Mosiera NS, Ladisch MR: **Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:408-415.
- Kim D, Hahn J: **Roles of the yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress.** *Applied and Environmental Microbiology* 2013a, **79**:5069–5077.
- Kim Y, Kreke T, Hendrickson R, Parenti J, Ladisch MR: **Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood.** *Bioresource Technology* 2013b, **135**:30-38.
- Kristensen JB, Börjesson J, Bruun MH, Tjerneld F, Jørgensen H: **Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose.** *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:888-895.
- Kristensen JB, Thygesen LG, Felby C, Jørgensen H, Elder T: **Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production.** *Biotechnology for Biofuels* 2008, **1**:5.
- Kunamneni A, Ghazi I, Camarero S, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M: **Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers.** *Process Biochemistry* 2008, **43**:169-178.

- Lane MM, Morrissey JP: ***Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow.** *Fungal Biology Reviews* 2010, **24**:17-26.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA: **Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi.** *Fungal Genetics and Biology* 2003, **38**:143-158.
- Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ: **Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999, **77-79**:91-103.
- Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ: **Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase.** *Applied and Environmental Microbiology* 2001, **67**:1163-1170.
- Lavoine N, Desloges I, Dufresne A, Bras J: **Microfibrillated cellulose-Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review.** *Carbohydrate Polymers* 2012, **90**:735-764.
- Lawther JM, Sun RC: **The fractional characterization of polysaccharides and lignin components in alkaline pre-treated and atmospheric refined wheat straw.** *Industrial Crops and Products* 1996, **5**:87-97.
- Liers, orn H, Steffen KT, Holfrichter M, Ullrich R: **Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agarcomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, **97**:5839-49.
- Liu, Hu, Wu Z, Zeng G, Huang D, Shen Y, He X, Lai M, Yibin He Y: **Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC.** *Environmental Science Pollution Research* 2014, **21**:14004-14013.
- Lu F, Ralph J: **Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins.** *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 1999, **47**:1988-1992.

- Luisa M, Goncalves FC, Steiner W. **Purification and Characterization of Laccase from a Newly Isolated Wood-Decaying Fungus.** En: T.W. Jeffries, I.L. Viikari (Eds.), American Chemical Society, Washington, USA, 258-266, 1996.
- Malek A: Development of Simultaneous Saccharification and Fermentation for Production of Ethanol from Softwood. <http://lup.lub.lu.se/record/467164>.
- Malliga P, Uma L, Subramanian G: **Lignolytic activity of the cyanobacterium *Anabaena azollae* ML2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer.** *Microbios* 1996, **86**:175-183.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO: **Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**:18849-18859.
- Mattinen ML, Kruus K, Buchert J, Nielsen JH, Andersen HJ, Steffensen CL: **Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides.** *FEBS Journal* 2005, **272**:3640-3650.
- McCaig BC, Meagher RB, Dean JF: **Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*.** *Planta* 2005, **221**:619636.
- McMahon AM, Doyle EM, Brooks S, O'Connor KE: **Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6.** *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:1435-1441.
- Michelin M, Ximenes E, Polizeli MLTM, Ladisch MR: **Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities.** *Bioresource Technology* 2016, **199**:275-278.
- Mikolasch A, Schauer F: **Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrids molecules and biomaterials.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, **82**:605-624.
- Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L: **The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **49**:492-498.

Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M: **Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.** *Bioresource Technology* 2012a, **106**:101-109.

Moreno AD, Ibarra D, Ballesteros I, González A, Ballesteros M: **Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase.** *Bioresource Technology* 2012b, **135**:239-45.

Moreno AD: **Estudio de enzimas oxidorreductasas en la transformación de biomasa lignocelulósica en biocombustibles: deslignificación y destoxificación.** Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid, 2013.

Moreno AD, Tomás-Pejó E, Ibarra D, Mercedes M, Olsson L: **Fed-batch SSCF using steam-exploded wheat straw at high dry matter consistencies and a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain: effect of laccase supplementation.** *Biotechnology for Biofuels* 2013a, **6**:160.

Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M: **Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*-Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings.** *Biochemical Engineering Journal* 2013b, **79**:94-103.

Moreno AD, Ibarra D, Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M: **A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production.** *Critical Review in Biotechnology* 2015, **35**:342-54.

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M: **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology* 2005, **96**:673-686.

Mussatto SI, Roberto IC: **Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review.** *Bioresource Technology* 2004, **93**:1-10.

Nakanishi A, Bae JG, Fukai K, Tokumoto N, Kuroda K, Ogawa J, Nakatani M, Shimizu S, Ueda M: **Effect of pretreatment of hydrothermally processed rice straw with**

laccase-displaying yeast on ethanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, **94**:939-948.

Nichols NN, Dien BS, Cotta MA: **Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:7545-7550.

Nigam PS, Singh A: **Production of liquid biofuels from renewable resources.** *Progress in Energy and Combustion Science* 2011, **37**:52-68.

Nguyen TTM, Iwaki A, Ohya Y, Izawa S: **Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2014, **117**:33-38.

Nonklang S, Abdel-Banat BMA, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, Yamada M, Akada R: **High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042.** *Applied and Environmental Microbiology* 2008, **74**:7514-7521.

Öhgren K, Bengtsson O, Gorwa-Grauslund MF, Galbe M, Hahn-Hägerdal B, Zacchi G: **Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400.** *Journal of Biotechnology* 2006, **126**:488-498.

Olsson L, Jørgensen H, Krogh KBR, Roca C: **Bioethanol production from lignocellulosic material.** En: Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility. Ed: Dumitriu, S. Marcel Dekker, Nueva york, EE.UU., 2005, 957-993.

Okuda N, Sonuera M, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S: **Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008, **106**:128-133.

Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Szengyel Z, Zacchi G, Réczey K: **Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment.** *Enzyme and Microbial Technology* 1997, **20**:286-293.

- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B: **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification.** *Bioresource Technology* 2000, **74**:17-24.
- Panagiotou G, Olsson L: **Effect of compounds released during pre-treatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007, **96**:250-258.
- Palonen H, Viikari L: **Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **86**:550-557.
- Pareek N, Gillgren T, Jönsson LJ: **Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses.** *Bioresource Technology* 2013, **148**:70-77.
- Pérez JA, Ballesteros I, Ballesteros M, Sáez F, Negro MJ, Manzanares P: **Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production.** *Fuel* 2008, **87**:3640–3647.
- Plan de Acción Nacional de Energías Renovables de España. PANER 2010-2020.
- Plan de Energías Renovables. PER 2011-2020.
- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS: **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, **67**:577-91.
- Qing Q, Yang B, Wyman CE: **Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:9624-9630.
- Qiu W, Chen H: **Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment.** *Bioresource Technology* 2012, **118**:8-12.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH, Boerjan W: **Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids.** *Phytochemistry Reviews* 2004, **3**: 29-60.

- Rencoret J, Aracri E, Gutiérrez A, del Río JC, Torres AL, Vidal T, Martínez AT: **Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers.** *Biochemical Engineering Journal* 2014, **86**:16-23.
- Rocha SN, Abrahão-Neto J, Cerdán ME, González-Siso MI, Gombert AK: Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microbial Cell Factories* 2010, **9**:4.
- Rugthaworn, Murata Y, Machida M, Apiwatanapiwat W, Hirooka A, Thanapase W, Dangjarean H, Ushiwaka S, Morimitsu K, Kosugi A, Arai T, Vaithanomsat P: **Growth Inhibition of Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus*, in Hydrolysates from Cassava Pulp.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014, **173**:1197-1208.
- Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Pérez-Boadad M, Martínez MJ, Martínez AT: **A new versatil peroxidase from *Pleurotus*.** *Biochemical Society Transactions* 2001, **29**:116-122.
- Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV: **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol.** *Process Biochemistry* 2005, **40**:3693-3700.
- Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez AT, Martínez MJ: **Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:7500-7506.
- Salvachúa D, Prieto A, Vaquero ME, Martínez AT, Martínez MJ: **Sugar recoveries from wheat Straw following treatments with the fungus *Irpex lacteus*.** *Bioresource Technology* 2013, **131**:218-225.
- Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Tuskan GA: **Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics** 2010, **4**: 209-226.
- Scheller HV, Ulvskov P: **Hemicelluloses.** *Annual Review of Plant Biology* 2010, **61**:263-89.
- Solomon EI, Baldwin MJ, Lowery MD: **Electronic structures of active sites in copper proteins.** *Chemical Review* 1993, **92**:521-542.

- Sterjiades R, Dean JFD, Eriksson KEL: **Laccase from Sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols.** *Plant Physiology* 1992, **99**:1162-1168.
- Sun XF, Sun RC, Fowler P, Baird MS: **Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005a, **53**:860-870.
- Sun XF, Xu F, Sun RC, Fowler P, Baird MS: **Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw.** *Carbohydrate Research* 2005b, **340**:97-106.
- Sun X, Bai R, Zhang Y, Wang Q, Fan X, Yuan J, Cui L, Wang P: **Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2013, **171**:1673-1680.
- Suzuki T, Endo Y, Ito M, Tsujibo Y, Miyamoto K, Inamori Y: Patent: JP2003230392 A2, 2003.
- Tanakaa T, Takahashia M, Hagino H, Nudejima S, Usuia H, Fujii T, Taniguchi M: **Enzymatic oxidative polymerization of methoxyphenols.** *Chemical Engineering Science* 2010, **65**:569-573.
- Thomsen MH, Thygesen A, Thomsen AB: **Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, **83**:447-455.
- Thurston CF: **The structure and function of fungal laccases.** *Microbiology* 1994, **140**:19-26.
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M, Olsson L: **Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains.** *Biotechnology and Bioengineering* 2008, **100**:1122-1131.
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, González A, Ballesteros I, Ballesteros M: **Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process.** *Fuel* 2009, **88**:2142-2147.

- Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I: **Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:4744-4753.
- Tejirian A, Xu F: **Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:239-47.
- Tomás-Pejó E: **Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso.** Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid, 2010.
- Tomás-Pejó E, Olsson L: **Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates.** *Microbial Biotechnology* 2015, **8**:999-1005.
- Torney F, Moeller L, Scarpa A, Wang K: **Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize.** *Biotechnology* 2007, **18**:193-199.
- Varga E, Klinke H, Réczey K, Thomsen A: **High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **88**:567-574.
- Wang J, Thiele S, Bollag JM: **Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002, **42**:1-8.
- Wen F, Sun J, Zhao H: **Yeast Surface Display of Trifunctional Minicellulosomes for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Ethanol.** *Applied and Environmental Microbiology* 2010, **76**:1251-1260.
- Wong DWS: **Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, **157**:174-209.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M: **Inhibition of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology* 2010, **46**:170-176.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M: **Deactivation of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:54-60.

Xu F: **The Encyclopedia of Bioprocessing Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation.** En: S.W. Flickinger, Drew (Eds.), Wiley, New York, pp. 1545-1554, 1999.

Yanase S, Yamada R, Kaneko S, Noda H, Hasunuma T, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A: **Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast.** *Biotechnology Journal* 2010, **5**:449-455.

Yang S, Land ML, Klingeman DM, Pelletier DA, Lua TS, Martin SL, Guo H, Smith JC, Brown SD: **Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*.** *PNAS* 2010, **107**:10395-10400.

Yoshida H: **Chemistry of Lacquer (Urusbz) part 1.** *Journal of Chemistry* 1883, **43**:472-486.

Yu Y, Feng Y, Xu C, Liu J, Li D: **Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:5123-5128.

Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J: **Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation.** *Biotechnology for Biofuels* 2010, **3**:26.

Zhu J, Yong Q, Xu Y, Yu S: **Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:1663-1668.

